

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04816

研究課題名(和文) 長期記憶形成における時計遺伝子periodの新規機能の解明

研究課題名(英文) Role of the circadian clock gene period in long-term memory

研究代表者

坂井 貴臣 (Sakai, Takaomi)

首都大学東京・理学研究科・准教授

研究者番号：50322730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ(以下、ハエ)で最初に発見されたperiod遺伝子(per)は、概日リズム形成のみならず、長期記憶形成にも必須である。本研究では単一ニューロン遺伝子発現システムを核として、ハエ時計細胞LNdで発現するPerの長期記憶における役割と、長期記憶形成に必須なPerの機能ドメインを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、LNdで発現するPerは長期記憶の形成に必須であることが明らかになった。さらに、Perタンパク質の機能ドメインの1つCCIDドメインが長期記憶形成に重要である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は時計遺伝子perが長期記憶形成に必須であることを世界で初めて見出した。ハエ脳ではリズム中枢以外の多くのニューロンでperが発現しているにもかかわらず、概日リズム以外の役割が不明である。申請者の発見以降、マウスの相同遺伝子Per1も記憶形成に関与することが報告された。しかし、記憶におけるPERの分子機能は不明であった。本研究で得られた結果は、動物の記憶形成のメカニズムを解明する上で貴重な情報になるのみならず、時計遺伝子の概日リズム以外の機能の解明にも貢献できることに意義がある。

研究成果の概要(英文)：The circadian clock gene, period (per), was initially identified as a circadian clock gene in *Drosophila*. We have reported that per is also critically involved in long-term memory (LTM) formation in *Drosophila*. In this study, we focused on one of the neural clusters in clock neurons (LNd) and studied the role of Per in LTM. First, we established a novel gene expression system to perform the LNd-specific gene expression. Using this system, we identified that Per is required for LTM formation. In addition, we determined that induction of Per lacking two PAS domains (Per<sup>PAS</sup>) in a part of per-positive neurons including LNds impaired LTM, indicating that Per<sup>PAS</sup> also has the dominant-negative effect on LTM formation. Per<sup>PAS</sup> includes the cycle/clock (transcription factor of Per) interaction domain (CCID). Thus, the CCID may be involved in LTM formation.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：長期記憶 時計遺伝子 period 概日リズムj

## 1. 研究開始当初の背景

### 時計遺伝子 *period* (*per*)の研究の背景

ハエで最初に同定された時計遺伝子 *per* は概日リズム形成に必須であり、多くの動物種に保存されている。概日リズムの研究から、リズム中枢における *per* の分子機能の詳細が明らかにされてきた (Allada & Chung, 2010)。しかし、ハエ脳ではリズム中枢以外の多くのニューロンで *per* が発現しているにもかかわらず、概日リズム以外の役割が不明であった。我々はハエの *per* は長期記憶形成に必須であるが、*per* 以外の時計遺伝子 [*timeless* (*tim*) など] は長期記憶形成に関与しないことを発見した (Sakai et al., 2004, PNAS 101: 16058-16063)。概日リズムの形成には、PER タンパク質と TIM タンパク質のヘテロ二量体形成が必須であることから、長期記憶形成における PER の機能は概日リズムと異なると考えられる。申請者の発見以降、マウスの相同遺伝子 *Per1* も長期記憶形成に関与することが報告された (Jilg et al., 2010; Rawashdeh et al., 2014)。しかし、長期記憶における PER の分子機能は未だ不明である。

### 長期記憶研究の背景

動物は自然界で学習したことを記憶し、生存に役立っている。動物が長期記憶を形成するためには、学習により新たなタンパク質を合成し、脳の特定ニューロン間のシナプス結合を強化すること(シナプス強化)が必要である (Okada et al., 2009)。よって、長期記憶形成を理解するためには、学習によるシナプス強化の分子機構の解明が不可欠である。遺伝学が発達しているハエは長期記憶の分子機構研究に利用されており、現在では、キノコ体と呼ばれるニューロパイルで複数の情報が統合されて長期記憶が作られると考えられている (Dubnau & Chiang, 2013)。申請者はこれまで、オスの求愛を利用した長期記憶測定法を確立し、複数の遺伝子を同定した。*per* 以外の長期記憶遺伝子の解析から、キノコ体が長期記憶形成に必要であることを報告した (Ishimoto et al., 2009; Sakai et al., 2013)。しかし、キノコ体において *per* の発現は確認されなかった (Sakai et al., 2012)。その後、*per* を発現する6個のニューロン (LNd 細胞群, 図1) 中の1つが概日リズムではなく長期記憶に必須であることを見出し、LNd-1 と名付けた (図1)。また、LNd 細胞群のポストシナプスがキノコ体出力部に存在していた。よって、LNd-1 はキノコ体の下流にあり、シナプスを介してキノコ体から情報を受け取っていると考えられる。



図1 ハエ脳内の*per*発現細胞

## 2. 研究の目的

本研究では、単一ニューロン遺伝子発現システムを核として、LNd-1 で発現する *Per* の長期記憶における役割と、長期記憶形成に必須な *Per* の機能ドメインを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### LNd-1 特異的な遺伝子発現システムの確立

#### 1) mCherry-off GFP-on システムの確立

目的遺伝子が発現していない場合は LNd-1 が赤色蛍光を発し、発現した場合は赤から緑へと蛍光が変化するシステムを実現する。まず、2つの FRT 配列の間に赤色蛍光タンパク質 mCherry と転写ストップを挟んだコンストラクトを UAS 配列下流に挿入する (図1)。さらにその下流に「目的遺伝子」「2A ペプチド配列」「GFP」をもつコンストラクトを作製する (図1)。ウィルス由来の 2A ペプチド配列を用いると、一度の転写で別々のタンパク質を作ることができ、実際にハエでも利用されている (Daniels et al., 2014)。FLP 非存在下では目的遺伝子は発現しないが、GAL4 発現細胞では mCherry が発現する (図1)。一方、FLP 存在下では、フリップアウトにより mCherry の発現が消失し、かつ、目的タンパク質と GFP が発現する (図1)。

目的タンパク質と GFP の融合タンパク質を作る方法とは異なり, この方法では目的タンパク質の機能を損なうことなく遺伝子発現の有無を GFP 蛍光で確認することができる点がメリットである。

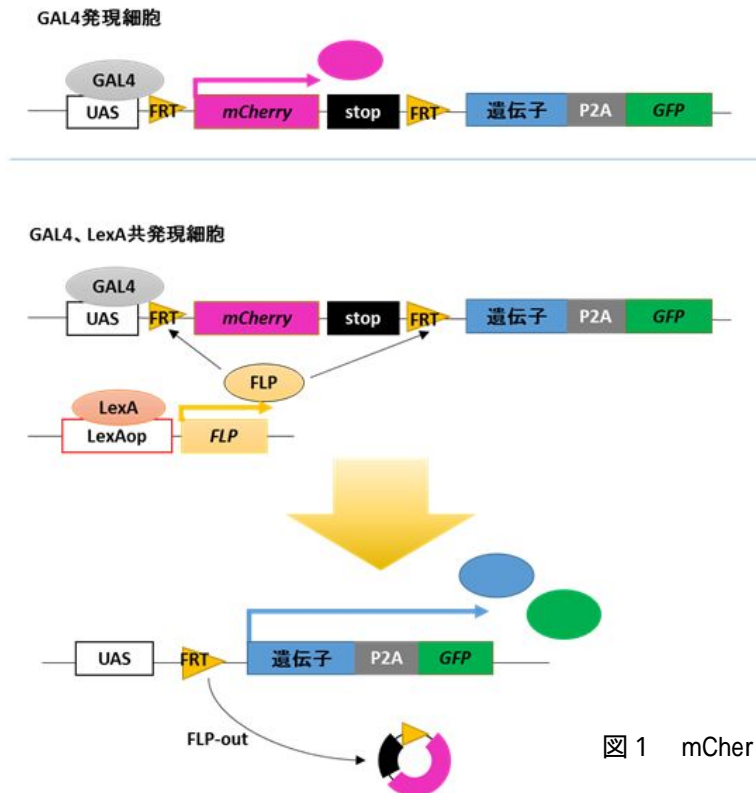


図 1 mCherry-off GFP-on システム

## 2) Split-GAL4 システムの確立

転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインと転写活性ドメインを別々のプロモーターにより発現させ、共発現した細胞のみに GAL4 が再構築される Split-GAL4 システムを利用し、LNd-1 のみで GAL4 が発現する Split-GAL4 システムを作製することで LNd-1 特異的な遺伝子発現制御を実現する。

### 長期記憶形成に必要な Per タンパク質ドメインの検証

LNd-1 特異的に以下の 4 つのトランスジーンを発現させ、長期記憶が消失するか行動解析により明らかにする: (1) *per* cDNA 全長, (2) PAS ドメインを欠失する *Per-ΔPAS*, (3) PAS ドメイン以降の配列を欠失する *Per-PAS*, (4) 転写因子 Clock/Cycle との interaction domain (CCID) を欠失する *Per-ΔCCID*, 光受容タンパク質 Cry との interaction domain を含む *Per-C*。

### LNd-1 と記憶中枢キノコ体のシナプス結合の有無

赤色蛍光を発するポストシナプスマーカー-Denmark もしくは緑色蛍光を発するプレシナプスマーカー Syt::GFP を LNd-1 特異的に発現させ、キノコ体ニューロン周辺にシグナルが検出されるか検証する。次に、GFP の再構成によるシナプス結合の検出法 (GRASP) を利用する (Feinberg et al. 2008)。キノコ体で GFP 断片 (GFP S11) を、また、LNd-1 でディテクター-GFP (GFP S1-10) を発現させ、キノコ体と LNd-1 のシナプス結合部のみを GFP で可視化する。

## 4. 研究成果

### mCherry-off GFP-on システムの確立

LNd 特異的な遺伝子発現を可能にするシステムを確立するため、我々は mCherry-off GFP-on システムを新たに構築した。このシステムでは、任意の GAL4 と LexA の組み合わせと LexAop-FLP、および mCherry-off コンストラクトの 4 つのトランスジーンを組み合わせる。mCherry-off コンストラクトでは、UAS 下流に FRT-

mCherry-stop-FRT 配列に続いて、目的遺伝子-P2A- GFP 配列が設計されている。mCherry-off-per-P2A-mCD8::GFP (UAS-FRT-mCherry-stop-FRT-per-P2A-mCD8::GFP) 系統を作製し、全神経細胞で発現する nsyb-GAL4 と heat-shock promoter-FLP (hs-FLP) と組み合わせた。脳を観察した結果、本来 Per が発現していない触角葉周辺の細胞で、Per と GFP の発現が確認された (図2)。よって、mCherry-off GFP-on システムを用いて目的遺伝子と GFP の共発現を誘導できることを確認した。

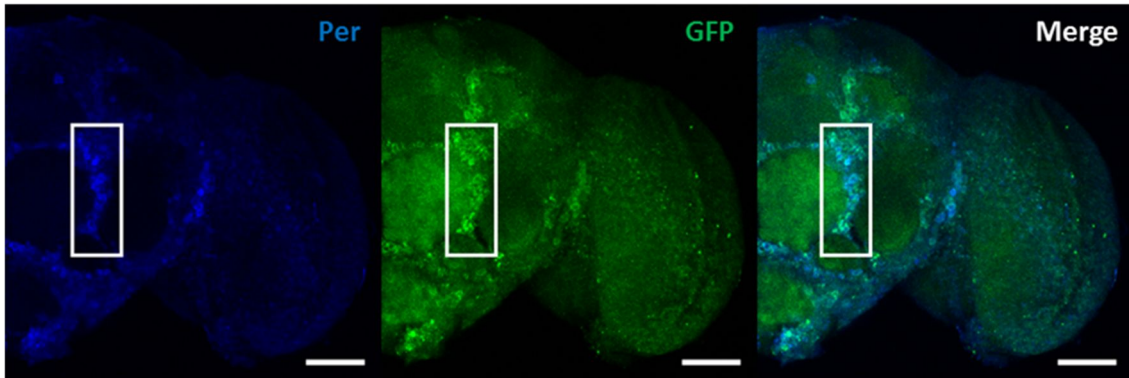


図2 mCherry-off-per-P2A-mCD8::GFP を用いた Per と GFP の共発現

続いて、mCherry-off- mCD8::GFP (UAS-FRT-mCherry-stop-FRT-mCD8::GFP) 系統を作製した。LNd で発現する LexA 系統と GAL4 系統の組み合わせを用いると、脳の片側で GFP 発現細胞が1つ確認された (図3)。細胞体の位置と、抗 Per 抗体で染色されることを合わせると、GFP 発現細胞は LNd であると考えられた (図3)。よって、mCherry-off GFP-on システムによる LNd-1 特異的な遺伝子発現を実現することができた。

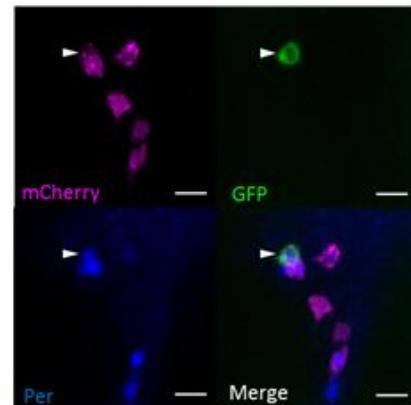


図3

#### Split-GAL4 システムの確立

。LNd は左右 6 個ずつの時計細胞で構成されるが、そのうち左右 2 個の時計細胞で GAL4 が発現する系統の作製に成功した (図4)。この系統を用いてシナプス伝達阻害実験を行い、LNd のシナプス伝達は長期記憶の固定化ではなく、維持に必須であることを見出した。

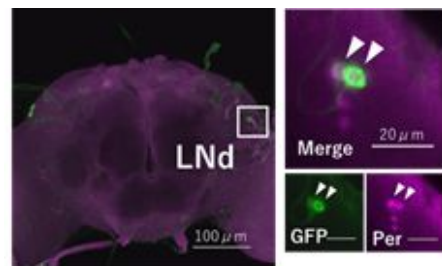


図4

#### LNd で発現する Per の役割

LNd で GAL4 が発現する系統を使い、時間的空間的遺伝子発現システム (TARGET) により記憶の固定化、維持、想起のタイミングで *per* の発現抑制する実験を行ったところ、*per* の発現は長期記憶の固定化に必須であることが示された。

#### 長期記憶形成に必要な Per タンパク質ドメインの検証

LNd で GAL4 が発現する系統を用い、LNd で Per を過剰発現して長期記憶を測定したところ、長期記憶は確認できなかった。よって、LNd の Per 過剰発現は、長期記憶形成における Per の機能を阻害すると考えられた。次に以下に示す4つのトランスジーンを LNd に強制発現する実験を行った: PAS ドメインを欠失する Per-ΔPAS, PAS ドメイン以降の配列を欠失する Per-PAS、Clock/Cycle との interaction domain (CCID) を欠

失する Per- $\Delta$ CCID, 光受容タンパク質 Cry との interaction domain を含む Per-C。

LNd で GAL4 が発現する系統を用いたところ、Per- $\Delta$ PAS の過剰発現は長期記憶を阻害したが、Per-PAS、Per-C の過剰発現は長期記憶に影響を与えなかった。さらに、LNd-1 特異的な Split-GAL4 を用いた実験から、Per- $\Delta$ CCID の過剰発現も長期記憶には影響を与えないことが明らかになった。これらの結果を踏まえると、Per 過剰発現による長期記憶阻害には、CCID ドメインが関与する可能性が考えられる。

#### LNd-1 と記憶中枢キノコ体のシナプス結合の有無

LNd-1 特異的な Split-GAL4 を用い、また、ポストシナプスマーカーである Denmark を発現させたが、シグナルが暗くポストシナプス部位を可視化するには至らなかった。一方、プレシナプスマーカーを発現し、LNd-1 のプレシナプスを可視化したところ、成虫脳の Dorsal 側にシグナルが検出された。しかし、ハエの記憶中枢(キノコ体)近傍ではシグナルは確認されなかった。今後は、トランスタンゴシステムなどを利用して LNd-1 の投射先を同定する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Show Inami, Shoma Sato, Shu Kondo, Hiromu Tanimoto, Toshihiro Kitamoto and Takaomi Sakai	4. 巻 40
2. 論文標題 Environmental Light Is Required for Maintenance of Long-Term Memory in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1427 ~ 1439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1282-19.2019">https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1282-19.2019</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Kazuki, Suzuki Yuki, Inami Show, Ohashi Hirono, Sakai Takaomi.	4. 巻 93
2. 論文標題 Light is required for proper female mate choice between winged and wingless males in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 119 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1266/ggs.18-00004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohashi H, Sakai T	4. 巻 499
2. 論文標題 Leucokinin signaling regulates hunger-driven reduction of behavioral responses to noxious heat in <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 221-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.132.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Shoma, Ueno Kohei, Saitoe Minoru, Sakai Takaomi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Synaptic depression induced by postsynaptic cAMP production in the <i>Drosophila</i> mushroom body calyx.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 2447 ~ 2461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1113/JP275799.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada N, Inami S, Sato S, Kitamoto S, Sakai T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Modulation of light-driven arousal by LIM-homeodomain transcription factor Apterous in large PDF-positive lateral neurons of the Drosophila brain	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Rep.	6. 最初と最後の頁 37255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/srep37255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mabuchi I, Shimada N, Sato S, Ienaga K, Inami S, Sakai T.	4. 巻 111
2. 論文標題 Mushroom body signaling is required for locomotor activity rhythms in Drosophila	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Neuroscience Res.	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.neures.2016.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 坂井貴臣	4. 巻 54
2. 論文標題 オス特有のトラウマ記憶の性スペクトラム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sato S., Ueno K., Sakai T.
2. 発表標題 Postsynaptic cAMP production predominantly contributes to synaptic depression in the Drosophila mushroom body calyx.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inami S., Shimada N., Sakai T.
2. 発表標題 Regulation of long-term memory processes by Drosophila LIM homeodomaintranscription factor Apterous in a cofactor-dependent and independent manner.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato T., Honjo K., Sakai T.,Furukubo-Tokunaga K.
2. 発表標題 Innate escapebehavior induced by activation of dopaminergic neurons relevant to punishmentsystem in Drosophila larvae.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki Y., Ienaga K., Mabuchi I., Sakai T.
2. 発表標題 Clock neurons involved in period dependent long-term memory in Drosophila.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inami S., Shimada N., Asano T., Sakai T.
2. 発表標題 Light-driven maintenance of long-term memory via the PDF neuropeptide signaling in Drosophila.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Ohashi H., Sakai T.
2. 発表標題 The neuropeptide signaling involved in starvation-dependent reduction of heat nociception in Drosophila.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mabuchi I., Suzuki Y, Ienaga K., Sakai T.
2. 発表標題 Identification of protein domains of the circadian clock protein Period critically involved in Drosophila long-term memory.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nemoto M., Sakai T.
2. 発表標題 Activity-dependent male courtship suppression induced by activation of olfactory projection neurons in Drosophila.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohashi H, Sakai T.
2. 発表標題 A neuropeptide signaling regulates starvation-dependent reduction of heat nociception in Drosophila
3. 学会等名 Annual meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sato S, Sakai T.
2. 発表標題 cAMP production induced by AL-MB synaptic transmission reduces Ca <sup>2+</sup> responses in Drosophila MB
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Inami S., Shimada N., Asano T., Sakai T.
2. 発表標題 Drosophila LIM homeodomain transcription factor Apteorus regulates acquisition and maintenance of long-term memory.
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ohashi H., Sakai T.
2. 発表標題 The exploration of neuropeptide involved in starvation-dependent reduction of heat nociception in Drosophila.
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Mabuchi I., Ienaga K., Sakai T.
2. 発表標題 The circadian clock gene, period, in the dorsal lateral neurons is critically involved in Drosophila long-term memory.
3. 学会等名 第39回日本神経科学大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ohashi H., Sakai T.
2. 発表標題 Brain is requires for starvation-dependent reduction of heat nociception in Drosophila adults.
3. 学会等名 JSCPB主催 国際シンポジウム "Environmental Sensing and Animal Behavior" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Sato S. and Sakai T.
2. 発表標題 Neural circuits required for courtship memory in Drosophila.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inami S., Sato T., Sato S., Shimada N., Sakai T.
2. 発表標題 Regulation of long-term memory consolidation by Cl <sup>-</sup> influx in Pdf neurons by Drosophila LIM homeodomain transcription factor, Apterous.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato T., Sato S., Sakai T.
2. 発表標題 Establishment of virtual courtship learning in Drosophila.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, YutoKurata, Takaomi Sakai
2. 発表標題 period-positive dorsal lateral neurons are required for maintenance of long-term memory in Drosophila.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto R., Inami S., Sakai T.
2. 発表標題 Photoreceptors involved in light-dependent maintenance of long-term memory in Drosophila.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井貴臣
2. 発表標題 神経ペプチドPDFを介した光による長期記憶維持システム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井貴臣
2. 発表標題 ショウジョウバエにおける光による長期記憶維持システム
3. 学会等名 生理研研究会「記憶・学習の統合理解に向けたアプローチ」(国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

・首都大学東京 教員紹介 <https://www.tmu.ac.jp/stafflist/data/sa/489.html>  
・プレスリリース 【首都大学東京】環境光による記憶維持機構の発見 <https://kyodonewsprwire.jp/release/202001105579>  
・EurekAlert! News Release 13-Jan-2020, "Using light to learn: Environmental light triggers production of memory proteins in fruit flies", Society for Neuroscience ([https://www.eurekalert.org/pub\\_releases/2020-01/sfn-ult010720.php](https://www.eurekalert.org/pub_releases/2020-01/sfn-ult010720.php))  
・EurekAlert! News Release 14-Mar-2020, "Can traumatic memories be erased?", Tokyo Metropolitan University ([https://www.eurekalert.org/pub\\_releases/2020-03/tmu-ctm031120.php](https://www.eurekalert.org/pub_releases/2020-03/tmu-ctm031120.php))

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武尾 里美  (Takeo Satomi)  (10642100)	首都大学東京・理学研究科・助教    (22604)	
研究分担者	上野 耕平  (Ueno Kohei)  (40332556)	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・副参事研究員    (82609)	