

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0172

研究課題名(和文) 記憶の分子実体の構成的理解

研究課題名(英文) Reconstruction of memory in *C. elegans*

研究代表者

杉 拓磨 (Sugi, Takuma)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・助教

研究者番号：70571305

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)：p38の活性変動をIn vivoで非侵襲に計測するために装置を開発し、論文化した。これらを用い、AVAニューロンにおけるp38の活性計測を行ったが、p38活性変動が検出されなかった。この理由として、生化学的に観察されたp38の活性変動は腸などの発現量の多い細胞種における活性変動を反映していた可能性がある。そこで現在、実際に記憶形成を促す振動刺激によるトレーニングを行い、AVAニューロンに発現させたプローブの蛍光強度に変化があるかを観察している。一方、遺伝子発現制御ツールをAVAニューロンに発現させた線虫株の作製に成功した。現在、記憶形成能への影響を評価している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既に生化学的実験からは記憶媒体と予想される分子メカニズムを捉えているが、本研究では、これを構成的に理解するために、計測系と操作系を作製までは行ったが、実際の線虫の記憶操作までには至らなかった。しかしながら、今後、これを継続し、仮に記憶操作まで至れば、これまでの要素還元主義的なアプローチとは異なる切り口により、記憶の分子メカニズムを示すことができることから、学術的・社会的に大きな意義が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous biochemical experiments had showed the phosphorylation of p38 oscillation. We succeeded in establishing two systems for quantifying the oscillation of p38 activity in vivo non-invasively and published that systems in two papers. We then actually quantified the p38 activity using them and found no oscillation of them. This could result from that the p38 oscillation reflects the intestine's event. We are therefore now trying to confirm the activity change of p38 under the mechanical stimulation. Secondary, we also established the tool for artificially manipulating the gene expression of *glr-1* downstream of p38. We now applied them for manipulating the mechanosensory memory of *C. elegans*.

研究分野：生物物理学

キーワード：C. elegans memory Synthetic biology

1. 研究開始当初の背景

記憶の物質的実体を細胞及び分子レベルで捉えることは、哲学や心理学から生物学の分野に至るまで、古くから最も重要な課題とされてきた。1990年、カンデルらはアメフラシの機械刺激に対する馴化学習・記憶現象の解析から、CRE 配列結合タンパク質 (CREB) が長期記憶形成に必須の転写因子であることを発見し、長期記憶は、遺伝子発現調節により規定されることが明らかになった (2000年ノーベル賞)。その後、CREB 依存的に発現変化する遺伝子を網羅的に探索することにより、記憶のメカニズムの解明は収束に向かうと期待された。ところが、多くの研究にもかかわらず、記憶の分子実体は明らかにされていない。その大きな原因の1つは、記憶を担う神経細胞は、脳神経系で膨大な数の神経細胞の中の少数であるため、細胞集団を対象に、CREB の下流遺伝子を探索した場合、記憶を担う神経細胞内の真の下流遺伝子の発現変化量は、それ以外の大多数の記憶に関与しない細胞集団の変化量の平均によりマスクされ、下流遺伝子の同定が難しいためと考えられる。つまり、記憶を担う神経細胞を見出し、その少数の神経細胞を対象とし、1細胞単位で解析することが必要不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究者は、線虫 *C. elegans* の記憶現象に着目してきた。*C. elegans* には、スクワイアの記憶分類で定義され、行動の可塑的变化を導く、明確な機械刺激の馴化学習・記憶現象が存在する。また、本研究者の研究から、力学刺激によるトレーニング過程で、哺乳類の記憶形成の目印である CREB のリン酸化が亢進したことから、*C. elegans* の記憶は哺乳類と類似した記憶であると考えられた。そして、このリン酸化は介在神経細胞 AVA と AVD で起こっていること、つまり、AVA と AVD の2つが記憶を保持する神経細胞であることを突き止めた (Sugi* et al. *PNAS*, 2014)。

記憶を担う神経細胞の位置情報が得られたことから、次に、分子レベルの記憶の実体を捉える必要がある。AVA と AVD には、哺乳類の興奮性神経伝達を担う AMPA 受容体の線虫オルソログ GLR-1 が特異的に高発現しており、*C. elegans* のトレーニング過程で、その発現量が減少することが知られていた (Rose et al. *J Neurosci*, 2003 他)。そこで、本研究者は、GLR-1 のプロモーターに結合する分子の酵母ワンハブリッドスクリーニングと遺伝学的解析を行った結果、転写因子 ATF2 (線虫オルソログ名 ATF-7) と p38 MAP キナーゼ (線虫オルソログ名 PMK-1/PMK-2) の分子経路が、*glr-1* 遺伝子発現との間にフィードバック機構を形成していることを見出した。さらに、*C. elegans* 集団を回収・破碎し、p38 のリン酸化の経時変化を生化学的に追跡した結果、p38 の活性は、振動刺激のない基底状態でオシレートし、*C. elegans* が振動刺激によるトレーニングを経験すると、再現よくオシレーションが減衰した。つまり、p38 の活性のオシレーションが、記憶の実体 (媒体) の有力な候補である可能性を見出した。そこで、大多数の神経細胞集団の中から、記憶を担う神経細胞のみを標的として遺伝子発現、つまり、ゲノム・エピゲノムを操作し、p38 活性のオシレーションの時間波形を変換し、行動レベルにおける記憶状態を創出することができれば、記憶の実体を明確にすることが可能と考え、これを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) レポーター実験系を用いた1細胞単位の時間波形計測系の確立と(2) 遺伝子発現操作による p38 の時間波形制御と記憶状態の人為的創出と消去の2つの計画を立案した。(1)については、予備段階の研究で、約100個体の *C. elegans* を回収し、ウエスタンブロットングにより、個体集団レベルで、p38 の活性を観察していた。この平均化された p38 の活性オシレーションの詳細なメカニズムを明らかにするためには、解析の解像度を高め、1個体、1細胞単位で解析する必要がある。そこで、AVA、AVD、さらにはネガティブコントロールとして腸細胞などで、p38 活性の時間パターンを検出するレポーター実験系を構築する。レポーター系については確立済みのゲノム編集技術 (Sugi* et al. *Dev. Growth Differ.*, 2014) を利用し、p38 の下流である AMPA 受容体のゲノム領域に、不安定化型 GFP の遺伝子を挿入した。*C. elegans* は体が透明であるため、異なる個体密度で飼育した *C. elegans* のレポーター-GFP の蛍光強度変化を体外から観察し、非侵襲に定量化した。(2)については、AVA と AVD の p38 の活性オシレーションを操作することによる記憶の人為的創出と消去を目指した。先述のように、p38 の活性は、AMPA 受容体 GLR-1 の遺伝子発現との間にフィードバック制御の関係がある。したがって、p38 の活性オシレーションが、真の記憶の媒体であるなら、GLR-1 の遺伝子発現状態を変えることにより、p38 の時間波形と行動の変化を同時に導くことが可能なはずである。計画(2)としては、主にゲノム編集技術と光操作技術を組み合わせて、GLR-1 遺伝子発現変動を操作する方法の構築を目指した。本研究で、記憶を人為的に創出もしくは消去することが可能となった場合、p38 の活性の時間波形が記憶媒体 (実体) であるという仮説の実証に大きく近づくと考えた。

4. 研究成果

レポーター系の構築については、平成 28 年度までに、この経時的変動を計測するため、*glr-1* 遺伝子の発現を定量化する方法を開発した。実験系としては *glr-1* 遺伝子の直下に半減期の短い不安定化型 EGFP を連結したレポーター-DNA を線虫の AVA ニューロンに発現させた。さらに、線虫の蛍光輝点を高速で追尾し、定量化するための顕微鏡を開発し、論文発表した(Sugi* et al. *Materials*, 2018)。平成 29 年度では、自ら開発した光学顕微鏡により、自由行動中の線虫のレポーター活性を定量化した。その結果、EGFP のシグナルに変動が見られた。しかしながら、この変動は不規則であることから、単純に計測時の自由行動している線虫の蛍光輝点のフォーカスのズレに起因したものである可能性もあり、束縛固定した線虫において、このレポーター活性の経時的な定量化を試みたが、それでも変動は見られなかった。次に別の方法として KTR テクノロジーを用いた p38 の活性評価系を構築し、AVA ニューロンにおける p38 の活性計測を行った。しかしながら、p38 の活性の変動が検出されなかった。以上の活性変動が見られなかった理由として、主に 2 つ考えられる。生化学的に観察されていた p38 の活性変動は腸などの発現量の多い細胞種における活性変動を反映していた可能性がある。つまり、AVA ニューロンでは p38 は活性変動をしていない可能性が考えられた。そこで、今後、まず実際に記憶形成を促す振動刺激によるトレーニングを行い、AVA ニューロンに発現させたプローブの蛍光強度に変化があるかどうかを観察する。また、そのために 振動刺激を精密に振る技術を開発し、論文化した(Sugi* et al. *Anal Sci*, 2016)。計画 2)については遺伝子発現制御ツールを AVA ニューロンに発現させた線虫株を準備した。ゲノム編集技術を利用し、*glr-1* のプロモーター領域に特異的に結合する、様々な TALE 型 DNA 結合ドメイン (TALE(*glr-1p*)とする)の cDNA を作製完了した。これを転写活性化ドメイン VP64、ヒストンアセチル化酵素 CBP1 やヒストン H3K4 脱メチル化酵素 LSD1 などと融合し、恒常的ではあるが、*glr-1* 遺伝子の発現を制御することに成功した。そこで現在、Koneremann et al. *Nature*, 2013 にならい、これらのツールを光応答性へ改変している。今後、光操作により、トレーニング過程もしくはその後において、GLR-1 の遺伝子発現を操作することにより、p38 の時間波形変化とそれに伴う記憶状態の創出・消去を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugi Takuma, Igarashi Ryuji, Nishimura Masaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Noninvasive Mechanochemical Imaging in Unconstrained <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1034 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma11061034	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 Sugi Takuma	4. 巻 1600
2. 論文標題 Genome Editing of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 247 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7128-2_20	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 -

1. 著者名 Sugi T, Okumura E, Kiso K, Igarashi R	4. 巻 32
2. 論文標題 Nanoscale Mechanical Stimulation Method for Quantifying <i>C. elegans</i> Mechanosensory Behavior and Memory.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1159-1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.32.1159	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

該当無し

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	竹内 祐子 (TAKEUCHI YUKO) (80452283)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	