

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19370

研究課題名（和文）老化に伴う記憶低下を制御する因子の網羅的探索

研究課題名（英文）Comprehensive screening for factors that regulate age-related memory decline

研究代表者

殿城 亜矢子（Tonoki, Ayako）

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：90645425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを含む生物は老化に伴い記憶が低下する。このような加齢性記憶障害は高齢者のQOLを低下させるため、そのメカニズムの解明が急務である。本研究では、加齢依存的に脳内で発現量が変化する遺伝子群をトランスクリプトーム解析により抽出し、ショウジョウバエの嗅覚記憶システムをモデル系とした記憶行動解析を行った。一連の解析により、加齢性記憶障害の原因候補遺伝子としてNOの受容体である可溶性グアニルシクラーゼ（sGC）のサブユニットを同定した。加齢に伴って脳神経系のNO-sGC経路が亢進することが記憶低下を引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NO-sGC経路は哺乳類でも保存されており、ヒト加齢性記憶障害を制御する候補遺伝子となり得る。またこれまでに、人工嗅覚記憶形成の変異体で同定された遺伝子は、ヒトを含む哺乳類でも機能的に重要であり、ヒトの記憶障害の原因解明につながった例は多い。本研究で明らかとなる加齢に伴う記憶低下の責任遺伝子群については、将来的にヒトを含む哺乳類でもその保存性を検討し、ヒトの加齢性の記憶障害に対する新薬開発の候補を挙げるなど新たな治療方法へつながる基盤を提供していく。さらには、加齢性記憶障害の生体内マーカーとしての有用性に繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：Organisms, including humans, lose their memory as they age. Since age-related memory impairment decreases the quality of life of the elderly, elucidation of the mechanism is urgently required. In this study, genes whose expression level changes in the brain in an age-dependent manner were extracted by transcriptome analysis, and memory behavior analysis was performed using the olfactory memory system of *Drosophila* as a model system. A series of analyzes identified a subunit of soluble guanyl cyclase (sGC), a NO receptor, as a candidate gene for age-related memory impairment. It was suggested that the enhancement of the NO-sGC pathway in the cerebral nervous system with age causes memory decline.

研究分野：神経科学

キーワード：老化 記憶 加齢性記憶障害 可溶性グアニルシクラーゼ NO合成酵素 ショウジョウバエ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

加齢性記憶低下は、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫など多くの種で共通してみられる現象である。超高齢社会が進行している日本では2020年に認知症患者が約600万人になることが予想されており、その後も患者数は増え続けると考えられている。加齢性記憶低下は高齢者やその家族のQOLにおいても重要な問題であるが、そのメカニズムには未だ不明な点が多い。

加齢は多くの疾患の要因になっており、これには加齢に伴う遺伝子発現の変化が関係している。脳内の遺伝子発現変化も加齢性記憶低下の原因となっている可能性が考えられるが、それらを網羅的に解析した研究は少ない。本研究では、ゲノムワイドな選択的・網羅的スクリーニングにより、加齢に伴う記憶低下を亢進/抑制する因子の同定を目指す。この様に、行動遺伝学的手法に老化といった長い時間軸を取り入れる研究は、下記に挙げた様々な難しい点により、これまでに行われてこなかった。

- ・ 一般的に行動解析や記憶行動解析は煩雑である。
- ・ 老齢個体の入手に時間がかかる。
- ・ 信頼性のある行動解析データを得るには、多数の個体を使用する必要がある。

特に哺乳類においては、多数の老齢個体を使用して信頼性のあるデータを得るには多大な時間と労力を必要とする。しかし本研究では、ショウジョウバエ嗅覚記憶をモデル系とすることによって下記の利点が生じる。

- ・ 嗅覚記憶を定量化する手法が確立されており、記憶行動解析が容易である。
- ・ 寿命が約2か月と短く、老齢個体の入手が容易である。
- ・ 生活環が約10日と短いため、多数の個体を得ることが容易である。

加齢に伴い脳内における発現量が変化することによって記憶低下の原因となる遺伝子群リストを網羅的に明らかにすることができれば、加齢性記憶障害のメカニズム解明に繋がるだけでなく、治療ターゲットの幅を広げることが可能である。

### 2. 研究の目的

本研究では、加齢依存的に発現量が変化する遺伝子群をトランスクリプトーム解析により抽出し、ショウジョウバエの嗅覚記憶システムをモデル系とした記憶行動解析により加齢性記憶障害の原因候補遺伝子を同定する(図1)。これらの候補遺伝子について遺伝学的行動解析を行うことによって、候補遺伝子が加齢性記憶障害の原因遺伝子である可能性を検討する。また、候補遺伝子について時期・領域依存的に遺伝子発現を操作した個体を作製して行動解析を行うことで、候補遺伝子が記憶低下の原因となる神経系を同定する。これにより、ショウジョウバエを起点としつつ、老化に伴う認知症発症に対する創薬につながるメカニズムの解明を目指す。

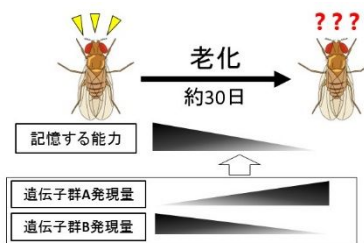


図1. 研究目的概要

老化に伴う発現量の変化が記憶低下の原因となっている遺伝子群を同定する

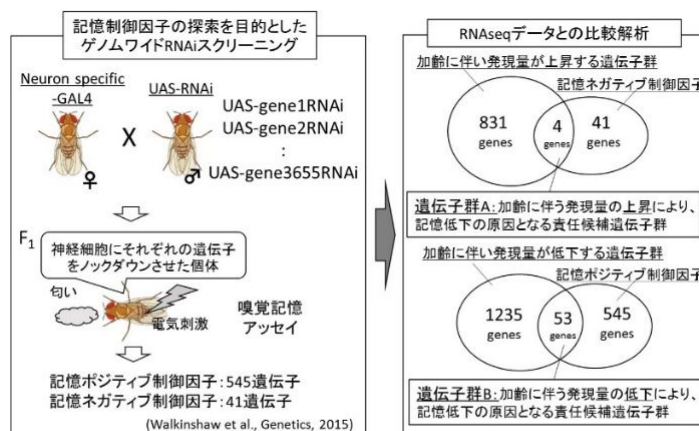
### 3. 研究の方法

#### (1) 加齢性記憶障害に関与する遺伝子群の同定

これまでに RNAseq 解析により、加齢に伴い発現量が変化する遺伝子プロファイリング、すなわち加齢により脳内で発現が上昇する遺伝子群 831 遺伝子、発現が低下する遺伝子群 1235 遺伝子のリストを得てきた。一方で、記憶形成を制御する因子を同定する目的でゲノムワイド網羅的遺伝学的スクリーニングが行われ、記憶ポジティブ制御因子 546 遺伝子、記憶ネガティブ制御因子 42 遺伝子が同定されている(図2・左; Walkinshaw et al., *Genetics*, 2015)。これらのリスト

を比較解析し、「遺伝子群 A」加齢に伴い脳内で発現量が増加することによって、記憶低下の原因となる責任候補遺伝子群を 4 遺伝子、「遺伝子群 B」加齢に伴い脳内で発現量が低下することによって記憶低下の原因となる責任候補遺伝子群 53 遺伝子を同定した(図2・右)。

これらの遺伝子群について、時期・場所特異的に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系である“gene-switch システム”(Roman et al., *PNAS*, 2001)を用いて神経細胞で発現量を一過的に改変し、老齢個体における記憶低下が抑制もしくは増悪するか検討



遺伝子群A: 老齢個体でそれぞれの遺伝子をUAS-RNAiによりノックダウンした個体における記憶測定  
遺伝子群B: 老齢個体でそれぞれの遺伝子をUAS-cDNAにより強制発現した個体における記憶測定

図2. 研究計画概要1

する。具体的には遺伝子群 A について老齢個体でそれぞれの遺伝子を UAS-RNAi によりノックダウンした個体における記憶能の測定を行う (図 2・下)。

(2) 加齢性記憶障害に関与する遺伝子群の脳内領域の検討  
 遺伝子群 A および B の中から加齢性記憶障害に関与する候補遺伝子を絞り込み、それらの脳内での発現場所および加齢に伴い発現量が変化する脳内領域を同定する。具体的には、候補遺伝子プロモーター-GAL4 に細胞膜 GFP を発現させて発現領域および遺伝子発現量の変化を定量する。さらに、これらの脳内領域における発現量の加齢性変化が記憶低下の原因であることを確かめるために、絞り込んだ脳領域で候補遺伝子の発現量を変化させ、老齢個体における記憶低下が抑制もしくは増悪するかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 加齢に伴い脳内で発現量が増加し、かつ記憶低下の原因となる候補遺伝子群「遺伝子群 A」の 4 遺伝子について、それぞれの遺伝子を神経細胞でノックダウンした個体の記憶を測定した。その結果、NO の受容体である可溶性グアニルシクラーゼ (sGC) のサブユニットを神経細胞でノックダウンすると記憶が向上することが明らかとなった (図 3)。sGC は Gyc と Gyc の 2 つのサブユニットからなる NO の細胞内受容体である。sGC の阻害剤である ODQ を一過的に投与した個体においても同様に記憶が向上した。このことより、sGC が記憶を負に制御していることが示唆された。

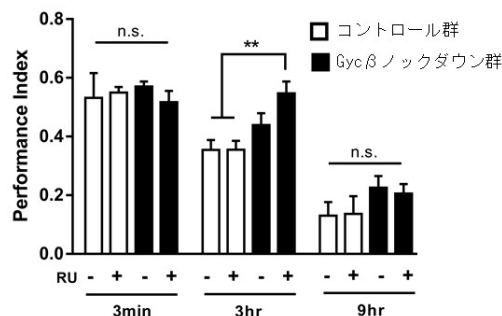


図3. 神経細胞でsGCのサブユニットGycβをノックダウンした個体では、中期記憶(3時間記憶)が向上する

(2) NO は L-アルギニンから NO 合成酵素 (NOS) によって産生され、細胞内で sGC に結合すると GTP から cGMP が作られる反応を触媒する。sGC の上流である NOS の記憶障害への関与を検討するため、薬剤依存性的および遺伝学的な手法により NOS を阻害した個体において嗅覚連合学習を行った。野生型の若齢個体に NOS の競合阻害剤である N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) を投与したところ、短期記憶は変化しなかったが中期記憶の有意な上昇が見られた。その一方で、NOS 阻害活性を持たないエナンチオマーである D-NAME を用いて同様の実験を行ったところ、記憶に変化は見られなかった。また遺伝学的な手法では、薬剤依存的に遺伝子発現を制御することが可能な GeneSwitch システムを用いて若齢個体で部位特異的かつ一過的に *Nos* をノックダウンした系統では記憶の有意な変化が見られなかった一方で、グリア細胞特異的に *Nos* をノックダウンした系統では中期記憶の有意な上昇が見られた。さらに、グリア細胞において一過的に NOS を過剰発現させた系統では中期記憶が有意に低下した。これらの結果から、グリア細胞の NOS が中期記憶を低下させる可能性が示唆された。

(3) 脳内における Gyc の発現場所を同定するために Gyc 発現細胞の細胞膜に GFP が発現する系統の成虫個体から脳を摘出し、共焦点顕微鏡で観察した。ショウジョウバエの記憶中枢であるキノコ体を観察したところ、記憶の獲得および固定化に関与するキノコ体のシナプスに Gyc の発現が見られた。若齢個体でキノコ体のシナプス特異的に *gyc* をノックダウンし嗅覚連合学習を行ったところ、短期記憶および中期記憶が有意に上昇した。この結果から、キノコ体シナプスにおける Gyc が記憶障害に関与することが示唆された。

(4) RNA-seq 解析により *gyc* の発現量が加齢に伴い増加することが示されたため、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を用いて頭部における *gyc*、*gyc*、*Nos* の mRNA レベルを測定し、若齢個体と老齢個体と比較した。*gyc* は加齢による発現量変化は見られなかったが、*gyc* は老齢個体で有意な増加が見られ、*Nos* についても増加傾向が見られた。また、Gyc 発現細胞の細胞膜に GFP が発現する系統の若齢個体と老齢個体を用いて GFP の蛍光強度を指標に Gyc の発現量を比較したところ、キノコ体の一部において発現量が有意に増加することが明らかとなった。

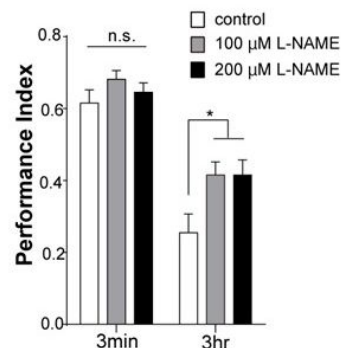


図4. L-NAMEを投与した老齢個体(30日齢)は中期記憶が向上する

(5) 老齢個体における NOS の記憶障害への関与を調べるため、野生型の老齢個体に L-NAME を投与し薬剤依存的に NOS を阻害した上で嗅覚連合学習を行った。その結果、短期記憶は変化しなかった一方で中期記憶が有意に上昇した (図 4)。また、NOS 阻害活性を持たないエナンチオマーである D-NAME を用いて同様の実験を行ったところ、記憶に変化は見られなかった。このことから、老齢個体において NOS が記憶障害に関与していることが示唆された。

本研究の結果から、Gyc はキノコ体の一部で機能し、NO-sGC 経路が加齢に伴い亢進することで記憶の低下をひきおこすことが示唆された。しかし、この経路の下流がどのようにして記憶を妨げているのかは不明である。グリア細胞由来の

NOが神経においてcGMPシグナルを活性化し神経細胞死を促進するという報告や神経のsGCが神経細胞死およびグリア細胞死を引き起こすという報告があるため、記憶に關与する神経またはグリアで細胞死が起こることで記憶障害につながっている可能性が考えられる。また、NOによるsGCの活性化がドパミン神経の変性に關与するという報告もある。ドパミン神経は記憶の固定化や忘却に關与することが知られているので、この機能が障害されることで記憶が低下している可能性もある。今後はNO-sGC-cGMP経路の活性を変化させた個体で、神経やグリア細胞の細胞死、および神経変性や關連分子の発現量変化を檢討するなどさらなる詳細な機構を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Yang, P., Kajiwara, R., Tonoki, A., and Itoh, M.	4. 巻 130
2. 論文標題 Successive and discrete spaced conditioning in active avoidance learning in young and aged zebrafish.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.10.005	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 1.*Tonoki A, Ogasawara M, Yu Z, Itoh M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Appetitive memory with survival benefit is robust across aging in Drosophila.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 2296-2304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2045-19.2020. Epub 2020 Jan 28.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saki Nagai, Zhihua Yu, Hiroki Takahashi, Motoyuki Itoh, Ayako Tonoki
2. 発表標題 NO-sGC pathway potentially contributes to age-related memory impairment in Drosophila.
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 呂偲哲、殿城亜矢子
2. 発表標題 Identification of neuropeptides regulating memory formation
3. 学会等名 第11回 分子高次機能研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 殿城亜矢子
2. 発表標題 インスリンシグナルによる記憶システムの恒常性維持機構
3. 学会等名 第39回日本基礎老化学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayako Tonoki <sup>1</sup> ○, Saki Nagai <sup>1</sup> , Zhihua Yu <sup>1</sup> , Kaho Yabana <sup>1</sup> , Hiroki Takahashi <sup>2</sup> , Motoyuki Itoh <sup>1</sup>
2. 発表標題 1.NO-sGC pathway is critical for age-related memory impairment in Drosophila
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Lyu, S., Tonoki, A.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 3048
3. 書名 Encyclopedia of Animal Behavior	

〔産業財産権〕

〔その他〕

生化学研究室・ホームページ <a href="http://www.p.chiba-u.jp/lab/seika/index.html">http://www.p.chiba-u.jp/lab/seika/index.html</a>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----