

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300144

研究課題名（和文） 脳老化を制御する新規経路の同定と解析

研究課題名（英文） A novel signaling pathway that regulates brain aging

研究代表者

齊藤 実 (SAITOE MINORU)

財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・参事研究員

研究者番号：50261839

研究成果の概要（和文）：

加齢による学習記憶力の低下(加齢性記憶障害)は脳老化の重要な表現型である。前回我々は PKA 抑制変異体では加齢性記憶障害が特異的に抑制されることを利用して、加齢性記憶障害と相関するタンパクの動態をプロテオミクス解析により調べ、ショウジョウバエ Pyruvate Carboxylase (PC)の相同タンパク dPC レベルの加齢による上昇が加齢性記憶障害と高い相関を持つことを見出した。今回、生化学的解析と遺伝学的解析を併せて行い、グリアでの PC 活性上昇が加齢性記憶障害を引き起こすことを明らかにした。また脳老化の重要なリスクファクターである酸化ストレスと加齢性記憶障害との関係を調べ、酸化ストレスとは独立した加齢性記憶障害の発生機構が存在することを見出した。そこで dPC レベルが酸化ストレスによるものか？逆に dPC レベルの上昇が酸化ストレスを発生するか調べたところ、いずれも起こらなかった。これらの結果から dPC 依存性の AMI 経路は従来の酸化ストレスによる経路とは異なる新規経路であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Age-related memory impairment (AMI) is a debilitating consequence of brain aging that can be suppressed in *Drosophila* by reducing PKA activity. However, the molecular mechanisms underlying AMI remain unclear. Using proteome analyses of wild-type and PKA mutants, we identified an AMI-associated increase in the activity of *Drosophila* pyruvate carboxylase (dPC), a mitochondrial anaplerotic enzyme. Genetic and biochemical data demonstrate that age-related increases in glial dPC cause AMI and that PKA mutations suppress AMI by reducing dPC activity. Although increased oxidative stress has been proposed to cause AMI, increases in dPC activity are not associated with increased oxidative stress. Strikingly, although the production of D-serine, a glia-derived NMDA receptor agonist, decreases in aged flies, this decrease is suppressed by dPC mutations and AMI is ameliorated by feeding flies D-serine. We propose a novel oxidative stress-independent AMI signaling pathway in which age-related increases in glial mitochondrial dPC activity cause AMI by reducing D-serine production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経化学・神経薬理学

キーワード：老化、学習記憶、遺伝子、ショウジョウバエ、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

加齢性記憶障害はショウジョウバエにもみられる脳老化の重要な表現型である。生物学的観点だけでなく、高齢化社会の対策からもその発生メカニズムの解明が期待されているが、発生の分子メカニズムは殆ど知られていない。我々はDCO 遺伝子によりコードされる PKA 触媒部位のヘテロ変異体 *DCO/+*では加齢性記憶障害が特異的に(寿命が延長していない)抑制されることを見出している。前回この結果をもとに *DCO/+*を用いたプロテオミクス解析を行い、ピルビン酸カルボキシラーゼのショウジョウバエホモログ dPC の加齢に伴う発現レベルの上昇が加齢性記憶障害を起こすこと、さらに *DCO/+*変異では dPC の発現レベルが低下していることなどを見出した。

2. 研究の目的

老化の主たる発生機序の一つに加齢に伴う酸化ストレスの上昇とミトコンドリア不全との相互作用による累進的な上昇が提唱されている。PC はミトコンドリアで TCA サイクルへのオキサロ酢酸補充酵素として働くが、哺乳類の脳に於いて神経細胞には発現せずグリア細胞で発現することが示されている。そこで本研究では以下の項目を中心に脳老化経路の解明を進めた。

(1) dPC が実際 PC としての機能を持つのか生化学的解析を行う。

(2) dPC がやはりショウジョウバエでもグリア細胞で発現し、加齢性記憶障害を引き起こすのか確かめる。

(3) 酸化ストレスがショウジョウバエでの加齢性記憶障害とどのような関与を持つのか検証を行う。

(4) また加齢に伴う dPC の活性上昇は酸化ストレスとどのような関係があるのか？ 遺伝学的・生化学的解析を行う。

3. 研究の方法

dPC 酵素活性の測定

myc タグ付き dPC をグリアに発現するトランスジェニックフライを作成し、抗 myc 抗体で dPC を単離した。ピルビン酸から PC により生成されたオキサロ酢酸を利用して起こるマレイン酸の生成過程で消費される NADH の消費量を指標にして活性を測った。一連の生化学反応は以下の反応緩衝液 (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaHCO₃, 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂,

10 mM pyruvate, 4 mM ATP, 200 μM acetyl-CoA, 10 U pig heart MDH, and 150 μM NADH) 内で行った。

ショウジョウバエ系統

*dPC/+*変異系統、グリア細胞特異的な GAL4 発現系統、神経細胞特異的な GAL4 系統、dPC 遺伝子に GFP を含む Mi {MIC} トランスポゾンの挿入系統、UAS-dPC⁺ トランスジェニック系統、UAS-sod1-IR ノックダウン系統などを行動解析、生化学実験などで用いた。

行動解析

匂いと電気ショックを組み合わせた匂い条件付け連合学習課題を用いて記憶力の定量的解析を行った。具体的にはティーチングマシーンという学習装置で、約 100 匹のハエに 2 種類の匂いのうち一つを電気ショックと共に 1 分間与え、他方の匂いはショックなしで矢張り 1 分間与える。記憶テストではどちらがショックと連合していたか弁別させ、正解したハエの比率から記憶スコアを算出した。

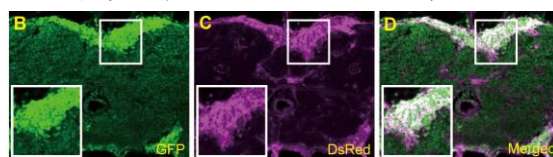
抗 dPC 抗体

dPC の C 末を抗原にウサギ抗ペプチド抗体を作成し、アフィニティ精製したものをウェスタンブロットティングなどで用いた。

4. 研究成果

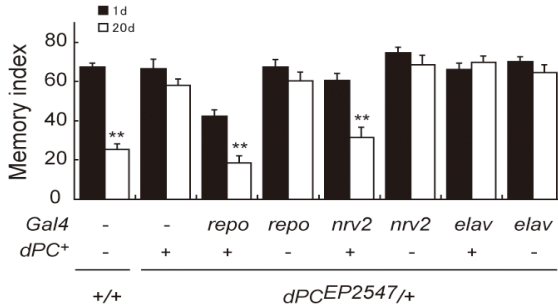
(1) dPC の PC 活性と加齢による変化：PC により生成されたオキサロ酢酸はマレイン酸デヒドロゲナーゼ (MDH) により NADH を還元してマレイン酸になる。そこで dPC と MDH のカップリング反応による NDAH の消費 (340 nm 吸光度の変化) を指標に dPC が確かに PC 活性を持つことを確認した。

(2) グリア dPC 活性と加齢性記憶障害との相関：dPC 遺伝子内に GFP を含むトランスポゾンが挿入した Mi {MIC} 系統では GFP が dPC と同じ発現パターンを示す。そこで GFP シグナルの発現を調べたところ(下図 B)、グリアマ



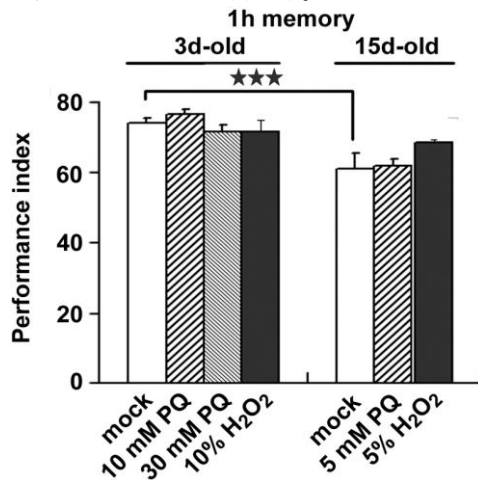
ーカー(下図 C)との顕著なシグナル重複(下図 C)が観察された。

さらに dPC⁺系統に遺伝子グリア細胞特異的に dPC⁺トランスジーンを発現させると (repo-Gal4 + dPC⁺または *nrv2*-Gal4 + dPC⁺) dPC^{EP2547}/+系統で加齢性記憶障害が回復した。しかし神経細胞特異的に dPC⁺トランスジーンを発現 (*elav*-Gal4 + dPC⁺) しても、dPC^{EP2547}/+系統の加齢性記憶障害は抑制されたままであった (下図)。

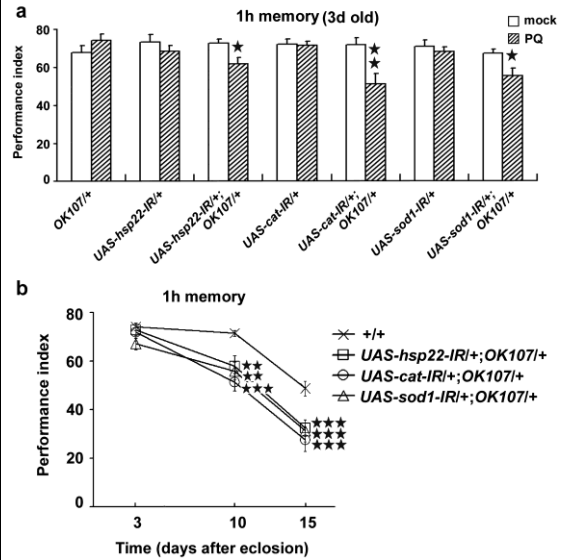


以上の結果からグリア細胞における dPC 活性の加齢に伴う上昇が加齢性記憶障害と因果関係を持つことが示唆された。

(3) 加齢性記憶障害と酸化ストレス：エネルギー代謝により発生する活性酸素種は通常活性酸素種除去機構により除去されるが、除去し切れなかった場合、遺伝子、細胞膜、タンパクなどと反応してその機能を阻害する酸化ストレスとなる。これまでの老化研究から、加齢とともに上昇する酸化ストレスが老化を促進し、加齢性記憶障害も引き起こすと考えられてきた。もし加齢性記憶障害が酸化ストレスにより起こるのであれば、加齢性記憶障害を呈した個体に活性酸素種を与えれば増悪化することが予想される。そこで加齢性記憶障害が顕在化する 15 日齢体に活性酸素種の過酸化水素 (H₂O₂) や産生化合物パラコート (PQ) を摂取させたが、予想に反して 1 時間記憶を指標とした加齢性記憶障害の亢進は見られなかった (下図)。

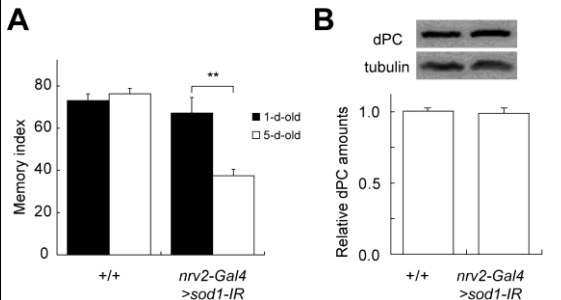


一方、活性酸素種除去機構を遺伝学的に低下させた系統に過酸化水素 (H₂O₂) や産生化合物パラコート (PQ) を摂取させる顕著な記憶障害が見られ (下図 a)、且つ加齢による記憶低

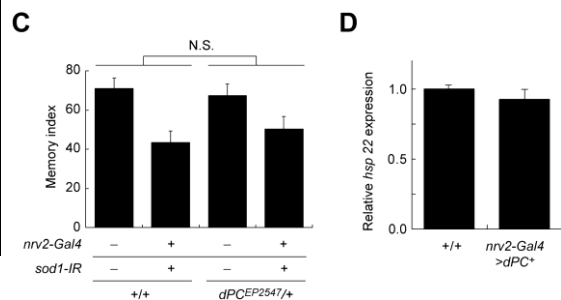


下が若い時から見られた (下図 b)。以上の結果から加齢により活性酸素種の産生が上昇するが、活性酸素種除去機構により記憶を障害するほどの酸化ストレスは生じないこと、少なくともショウジョウバエでは活性酸素種除去機構が低下する以前から始まる加齢性記憶障害機構があることが示唆された。

(4) dPC 依存性の加齢性記憶障害と酸化ストレスとの関わり：dPC レベルの上昇が酸化ストレスの上昇に因るものか明らかにするため、まず活性酸素種除去機構が抑制された系統で dPC レベルを検証した。この系統では酸化ストレスの上昇により記憶障害が観察されたが (下図 A)、dPC レベルの上昇は見られなかった (下図 B)。



さらに活性酸素種除去機構の低下により起こった記憶障害は dPC 変異により改善されず (下図 C)、グリアに dPC⁺を過剰発現させて記憶障害を引き起こしても酸化ストレスのマーカーである hsp22 の発現は上昇しなかった (下図 D)。



以上の結果から dPC 活性による加齢性記憶障害機構は酸化ストレスによる障害とは異なる新規経路であることが示唆された。

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 11 件)

- ① Miyashita T, Oda Y, Horiuchi J, Yin JC, Morimoto T, Saitoe M. Mg²⁺ block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron* (in press). 査読有
- ② Naganos S, Horiuchi J, Saitoe M. (2012). Mutations in the *Drosophila* insulin receptor substrate, CHICO, impair olfactory associative learning. *Neurosci Res* **73**, 49-55. 査読有
- ③ Saitoe M, Saeki S, Hirano Y, Horiuchi J. Age-related memory impairment in *Drosophila*. *Encyclopedia of Behavior Genetics*. (in press). 査読有
- ④ Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. (2012). Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior* **11**, 79-86. 査読有
- ⑤ Yamazaki D, Horiuchi J, Miyashita T, Saitoe M. (2010). Acute inhibition of PKA activity at old ages ameliorates age-related memory impairment in *Drosophila*. *J Neurosci*. **30**, 15573-15577. 査読有
- ⑥ Tamura T, Horiuchi D, Chen, Y. C, Sone M, Miyashita T, Saitoe M, Yoshimura N, Chiang A. S, Okazawa H. (2010). *Drosophila* PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci*, **30**, 14091-14101. 査読有
- ⑦ Yamazaki D, Horiuchi J, Saitoe M. (2010). Genetic dissection of age-related memory impairment in *Drosophila*. *Hirotsuki Med J*, **61**, S26-S33. 査読有
- ⑧ 平野恭敬、齊藤 実 (2010). 脳の老化：加齢性記憶障害とその分子機構 *メヂカルバイオ* **7**, 24-29 査読無
- ⑨ 松野元美、齊藤 実 (2010). 学習・記憶と分子マーカー *月刊臨床医学* **12**, 1375-1379 査読無
- ⑩ 上野耕平、齊藤 実 (2010). 記憶学習の精緻な理解に向けてのモデル動物：ハエ *生体の科学* **61**, 17-23 査読

無

- ⑪ Matsuno M, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. (2009). The *Drosophila* CAM Klingleon is required for long-term memory formation and is regulated by Notch. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 310-315. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- ① 上野耕平、齊藤 実 in vivo imaging analysis of neural plasticity in mushroom body neurons. 「Visualization and optic control of neural circuit underlying behavior」第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ (横浜 2011.12.13)
- ② 平野恭敬、齊藤 実 Maintenance of long-term memory requires persistent regulation of gene expression 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜 2011.12.13)
- ③ 齊藤 実 ショウジョウバエを用いて何が記憶を作るのかを知り、記憶が出来るところを見る バイオカンファレンス 2011 (東京 2011.11.11)
- ④ Ueno K, Naganos S, Saitoe M. (2011). Learning-related synaptic plasticity in the *Drosophila* mushroom bodies require correlated activation of NMDA, acetylcholine and dopamine D1 receptors. in *Neurobiology of Drosophila*. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA 2011. 10.6).
- ⑤ Hirano Y, Saitoe M. (2011). Maintenance of long-term memory requires persistent regulation of gene expression. in *Neurobiology of Drosophila*. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA 2011. 10.4).
- ⑥ 平野恭敬、齊藤 実 長期記憶の保持には持続的な遺伝子発現制御が必須である 第 34 回日本神経科学学会 (横浜 2011.9.17)
- ⑦ 上野耕平、長野慎太郎、齊藤 実 Correlated activation of dopamine receptor is an essential for associative synaptic plasticity relevant to olfactory aversive memory. 第 34 回日本神経科学学会 (横浜 2011.9.15)
- ⑧ 松野元美、齊藤 実 Neuron-glia interaction via *Drosophila* CAM Klingleon modulates Repo-mediated glial gene expression required for long-term memory formation. 第 34 回日本神経科学学会 (横浜 2011.9.15)
- ⑨ Saitoe M (2011). Regulation of

- Drosophila age-related memory impairment by glial cells. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference. (Janelia Farm Research Campus, VA, USA 2011.5.16).
- ⑩ 平野恭敬、齊藤 実 行動を司る長期記憶の保持にはエピジェネティックな制御が関与する。第33回日本分子生物学会年会 (神戸 2010.12.9)
- ⑪ 上野耕平、齊藤 実 遺伝子と行動を繋ぐ脳機能の蛍光イメージング解析。「行動は遺伝子でどこまで規定されるか」第33回日本分子生物学会年会ワークショップ (神戸 2010.12.8)
- ⑫ 松野元美、齊藤 実 ショウジョウバエ細胞接着因子Klingonを介した神経・グリア相互作用は長期記憶形成に必要なグリアでの転写を調節する。第33回日本分子生物学会年会 (神戸 2010.12.7)
- ⑬ 宮下知之、齊藤 実 なぜ長期記憶形成には間が必要か？第33回日本分子生物学会年会 (神戸 2010.12.7)
- ⑭ Ueno K, Naganos S, Saitoe M. (2010). Associative neural plasticity in the mushroom body of *Drosophila*. in *System molecular ethology and beyond* (Tokyo 2010. 11.10)
- ⑮ 上野耕平、齊藤 実 一過性ドパミン処理はキノコ体ニューロンの反応性を増強させる。第33回日本神経科学学会 (神戸 2010.9.4)
- ⑯ 田村拓也、堀内大輔、Yi-Chung Chen、曾根雅紀、宮下知之、齊藤 実、吉村奈津恵、Ann-Shyn Chiang、岡澤均 感覚二次ニューロン依存的な記憶に関わる新規分子、dQBP1。第33回日本神経科学学会 (神戸 2010.9.2)
- ⑰ 長野慎太郎、上野耕平、齊藤 実 ショウジョウバエの chico 遺伝子の変異はキノコ体の神経の可塑性を阻害する。第33回日本神経科学学会 (神戸 2010.9.2)
- ⑱ 齊藤 実 加齢に伴う記憶力低下の分子機序 年齢軸生体恒常性研究会シンポジウム 年齢・健康・疾患—生命の統合的理解にむけて (つくば 2010.3.5)
- ⑲ Matsuno M, Horiuchi J, Tully T, Saitoe M. (2009) The *Drosophila* CAM Klingon is required for memory consolidation via neuron-glia interaction. 第32回日本分子生物学会年会シンポジウム「神経回路を基盤とするシステム分子行動学」 (横浜 2009.12.9)
- ⑳ 齊藤 実 cAMP/PKA シグナリングによる脳の老化機構 第31回日本基礎老化学会シンポジウム「老化に伴う生体ネッ

トワーク変化の解明に向けた新たなトレンド」 (東京 2009.10.31)

- ㉑ Nagano S, Saitoe M. chico, a *Drosophila* insulin receptor substrate homolog is required for olfactory learning. in *Neurobiology of Drosophila*. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA 2009.10.1).
- ㉒ 上野耕平、齊藤 実 培養ショウジョウバエ脳における神経応答の高速スキャンニングコンフォーカル顕微鏡による可視化 第32回日本神経科学大会 (名古屋 2009.9.18)
- ㉓ 松野元美、堀内純二郎、Tim Tully、齊藤 実 ショウジョウバエ細胞接着因子KlingonはNotch依存的な長期記憶形成に必要な。第32回日本神経科学大会 (名古屋 2009.9.17)
- ㉔ 宮下知之、齊藤 実 (2009) なぜ長期記憶形成に間が必要か？第32回日本神経科学大会 (名古屋 2009.9.16)
- ㉕ Yamazaki D, Saitoe M. Ram, a mutation of the *Drosophila* pyruvate carboxylase ortholog, suppresses age-related memory impairment. 第9回日本ショウジョウバエ研究会ワークショップ、(掛川市 2009.7.8)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称：加齢性記憶障害の治療用及び予防用医薬組成物

発明者：齊藤実、山崎大介、宮下知之

権利者：財団法人東京都医学研究機構

種類：特許

番号：PCT/JP2010/072338

出願年月日：平成22年12月13日

国内外の別：国際

名称：加齢性記憶障害の治療用及び予防用医薬組成物

発明者：齊藤 実、山崎大介

権利者：財団法人東京都医学研究機構

種類：特許

番号：特願 2009-287741

出願年月日：平成21年12月18日出願

国内外の別：国内

名称：加齢性記憶障害マーカーとしてのリン酸化ピルビン酸カルボキシラーゼ

発明者：齊藤 実、山崎大介

権利者：財団法人東京都医学研究機構

種類：特許

番号：特願 2009-112761

出願年月日：平成 21 年 5 月 7 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：加齢性記憶障害が抑制された非ヒト動物

発明者：齊藤 実

権利者：財団法人東京都医学総合研究所

種類：特許

番号：4948826

取得年月日：平成 24 年 3 月 16 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/memory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 実 (SAITOE MINORU)

財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・参事研究員

研究者番号：50261839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし