

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15186

研究課題名（和文）活動依存的なドーパミン神経の機能変化による記憶制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of memory by activity-dependent functional changes in dopaminergic neurons

研究代表者

木矢 星歌（Takayanagi-Kiya, Seika）

金沢大学・生命理工学系・特任研究員

研究者番号：40793196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではショウジョウバエ雄の「求愛学習」をモデルとして、ドーパミン神経における活動依存的な初期応答遺伝子の発現が長期記憶に与える影響とその神経基盤について調べた。初期応答遺伝子Hr38をドーパミン神経で過剰発現させると、通常より短時間の刺激でも長期記憶が形成された。この効果は、学習時の一過的なH38過剰発現でも見られた。また、Hr38をノックダウンした場合には長期記憶の障害が起こった。さらに、Hr38はごく少数のドーパミン神経で記憶の制御に関わることを発見した。Hr38は他の遺伝子の発現を調整する核受容体をコードし、進化的に保存されていることから、他の動物でも長期記憶に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学習と記憶により行動を変化させることは、動物が生存や繁殖の競争を勝ち抜くために重要な能力である。神経活動依存的に発現する初期応答遺伝子は、脊椎動物においては学習・記憶の基盤となる神経可塑性にとって重要であることが知られてきた。一方昆虫の初期応答遺伝子の脳高次機能における役割はほとんど不明である。本研究は初期応答遺伝子Hr38が昆虫の学習・記憶という脳の高次機能における役割を持つことを初めて報告するものである。さらに、本研究は、神経機能のモジュレーターとして働くと考えられてきたドーパミン神経自体が、学習時に活動依存的に機能変化するという新たな記憶機構の存在を示唆する点で重要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated how the expression of an immediate early gene in dopaminergic neurons affects long-term memory, using the courtship conditioning paradigm of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Overexpression of Hr38, a conserved immediate early gene, in dopaminergic neurons facilitated the formation of long-term memory. Notably, transient overexpression during the training period was sufficient for this effect. Conversely, knock-down of Hr38 caused defects in long-term memory. Additionally, our findings indicate that the expression of Hr38 in a small subset of specific dopaminergic neurons are responsible for these effects. Given that Hr38 encodes a nuclear receptor and is widely conserved, it may play important roles in other animals as well.

研究分野：神経生物学

キーワード：長期記憶 初期応答遺伝子 即初期遺伝子 神経生物学 ショウジョウバエ 昆虫 ドーパミン神経 性行動

1. 研究開始当初の背景

神経活動依存的に発現する初期応答遺伝子は、神経活動マーカーとして有用であると共に学習・記憶の基盤となる神経可塑性にとって重要な役割を持つ。しかし、昆虫の初期応答遺伝子の脳高次機能における役割には不明な点が多い。我々のグループはこれまでに、昆虫から哺乳類まで進化的に保存された初期応答遺伝子として *Hr38* および *Stripe* を同定した。これらの遺伝子は転写因子をコードし、それぞれ哺乳類の初期応答遺伝子 *Nr4a* と *EGR1* のホモログである。

ショウジョウバエの雄は一定期間求愛を行っても雌に拒絶され続けると(求愛条件付け)、その後記憶依存的に求愛活性が低下する。これを利用して *Hr38* 発現の記憶への影響を解析したところ、*Hr38* を過剰発現させると、通常では短期記憶しか形成されない短時間の刺激でも長期記憶が形成された。この長期記憶の形成促進は、学習時の一過的な *H38* 過剰発現でも見られた。また、*Hr38* を神経系でノックダウンしたショウジョウバエでは長期記憶の障害が起こった。

さらに、*Hr38* が機能する神経を特定するため、様々な神経細胞種特異的なドライバーを用いて網羅的なスクリーニングを行った。その結果、*Hr38* はドーパミン神経の一部で記憶の制御に関わることを見出した。これら独自の知見と、*Hr38* がドーパミン合成酵素発現を制御することを報告した先行研究 (Davis et al., *Genome*, 2007) から、申請者は学習時にドーパミン神経で *Hr38* が活動依存的に発現し、神経機能を調節することで長期記憶の形成・維持を促進するという仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類に比べ単純で解析しやすい脳と、哺乳類と相似のドーパミンによるシグナル伝達系を持つショウジョウバエをモデルとして、学習成立の際にドーパミン神経で神経活動依存的にどのような現象が起こり行動変化へとつながるのか、細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として行った。具体的には、ショウジョウバエのドーパミン神経が、学習時に初期応答遺伝子 *Hr38* の働きによって機能変化するという新たな記憶メカニズムの存在を提唱し、これを検証した。

3. 研究の方法

ショウジョウバエの雄は雌から繰り返し求愛を拒絶される(コンディショニング)と記憶依存的に求愛活性が低下する。この際、コンディショニングの長さに応じて数時間以内に消失する短期、または数日間維持される長期記憶を形成することが知られる。本研究では、コンディショニングから一定時間置いた後に雄を新たな雌に対峙させ、10 分間の観察時間を設けてその間の求愛活性を Courtship Index (CI) として測定した。また、ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて、特定の神経細胞において一過的に *Hr38* の過剰発現あるいはノックダウンを行い、記憶への影響を調べた。

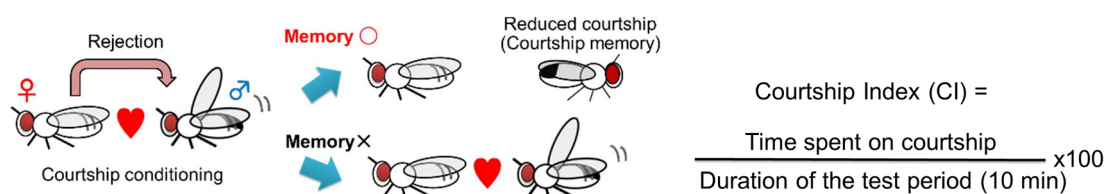


図 1. (左) 雌から求愛を繰り返し拒絶(求愛条件付け)された雄は、記憶依存的に求愛活性が低下する。記憶の無い雄は通常通り求愛する。(右) 求愛活性の指標となる Courtship Index (CI) の計算方法。本研究では 10 分間の観察時間

に占める求愛時間の割合。

4. 研究成果

1. 学習中の一過的な *Hr38* 過剰発現により長期記憶形成が促進される

ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いて、薬剤 (RU486) 投与により一過的に *Hr38* を過剰発現させ、その 24 時間後に記憶を調べた。ここで行った 1 時間のコンディショニングでは、本来ならば 24 時間後の記憶 (長期記憶) は成立しない。実際に、コントロールでは求愛活性の低下は見られなかった。一方、神経系全体で *Hr38* を過剰発現させたバエでは、1 時間のコンディショニングを行った Conditioned 群でコンディショニングを経験しなかった Naive 群と比べて 24 時間後の CI が低下しており、長期記憶が成立していることがわかった (図 2 左)。この結果は、*Hr38* には長期記憶の形成を促進する働きがあることを示唆している。また、この効果は学習時の一過的な過剰発現でも見られたが、学習後の過剰発現では見られなかった (図 2 中央、右)。

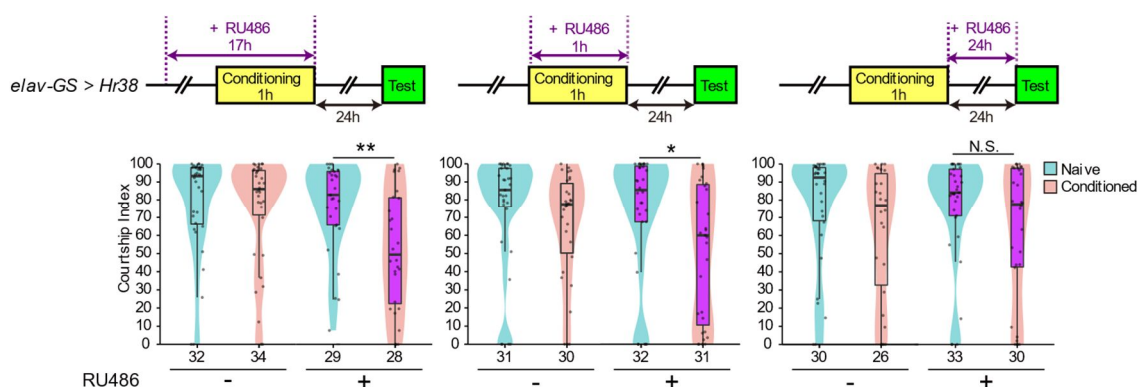


図 2. 遺伝学的手法により薬剤 (RU486) 投与時にのみ *Hr38* を神経系に過剰発現する雄のショウジョウバエに 1 時間のコンディショニング (求愛学習) を経験させ、24 時間後の記憶を測定した。(左) 学習前から学習中に過剰発現させた雄では長期記憶が形成された。(中央) 1 時間の学習中にのみ過剰発現させた雄でも長期記憶が形成された。(右) 学習後の過剰発現は長期記憶の形成に影響しなかった。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Mann-Whitney U 検定。

2. *fruitless* を発現する一部のドーパミン神経における *Hr38* 発現が長期記憶に関わる

様々なドライバーを用いて *Hr38* を細胞腫特異的に過剰発現させ、どの神経細胞における発現が記憶に影響しているのかを調べた。その結果、ドーパミン神経の一部である PAM 神経、その中でも性決定遺伝子 *fruitless* を発現する細胞における *Hr38* 発現が重要であることがわかった (図 3)。

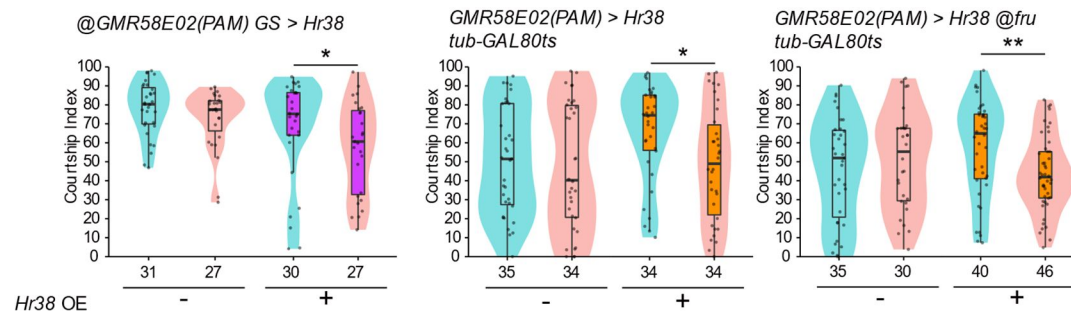


図 3. (左、中央) ドーパミン神経の一部である PAM 神経特異的に *Hr38* を過剰発現させた雄、(右) PAM 神経のうち *fruitless* を発現する細胞で *Hr38* を過剰発現させた雄ではいずれも長期記憶形成の促進が起こった。いずれの実験においても、遺伝学的手法を用いて学習前から学習中に一過的に *Hr38* を過剰発現させた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Mann-Whitney U 検定。

さらに、*Hr38* のノックダウンによる長期記憶への影響を調べた。ショウジョウバエの雄は 8 時間のコンディショニングを経験すると通常数日間持続する長期記憶を形成する。そ

ここで、PAM 神経特異的に *Hr38* の発現をノックダウンし、8 時間のコンディショニングを行い 3 日後の記憶への影響を調べた。その結果、ノックダウンを行っていないコントロール群では長期記憶が維持されていたのに対しノックアウト群では長期記憶が見られなかった (図 4 左)。また、8 時間のコンディショニング中の一過的な *Hr38* ノックダウンでも 3 日後の長期記憶が見られなくなった (図 4 右)。これらの結果は、PAM 神経における学習中の *Hr38* 発現が長期記憶の形成に必要であることを示唆している。

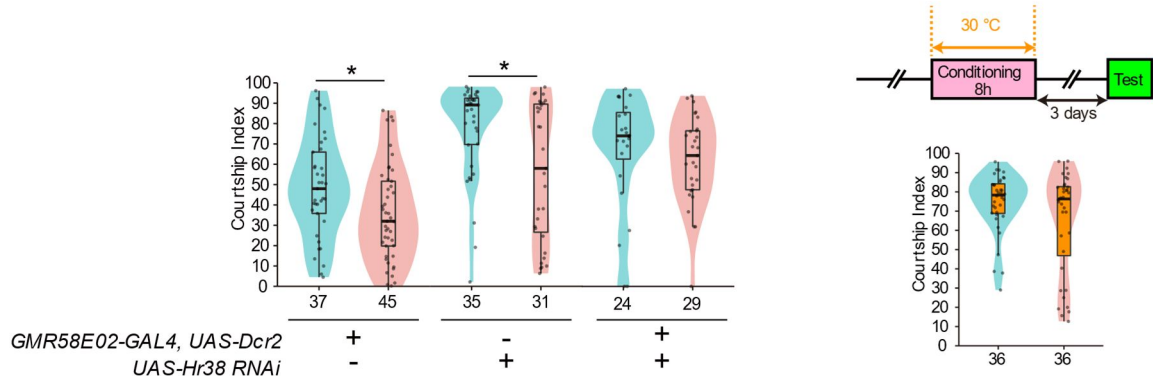


図 4. (左)PAM 神経において *Hr38* をノックダウンした群では、コンディショニングから 3 日後の記憶が見られなかった。(右)遺伝学的手法を用いて 8 時間のコンディショニング中のみ *Hr38* のノックダウンを行った結果、長期記憶が障害された。*: $p < 0.05$, *: $p < 0.01$, Mann-Whitney U 検定。

以上の結果から、*Hr38* が長期記憶を制御する機構として、次のような仮説を考えている。まず、コンディショニング時に雄が行う求愛行動によって *Hr38* が *fruitless* 陽性 PAM 神経において発現上昇する。*Hr38* がターゲット遺伝子の発現を制御することによりドーパミン神経の機能に変化が生じ、投射先のキノコ体神経の活動を変化させる。これらによって性行動をつかさどる神経回路機能が調節される求愛活性が変化する。

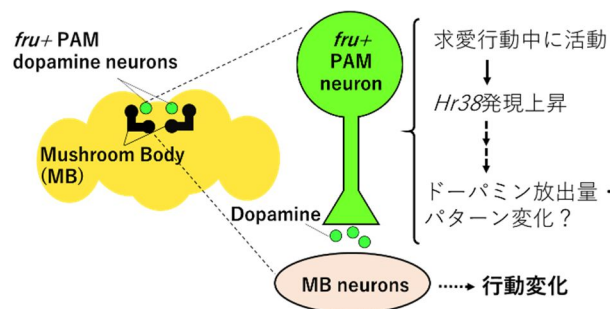


図 5. *Hr38* による長期記憶制御機構の仮説。

<引用文献>

1. Davis MM, Yang P, Chen L, O'Keefe SL, Hodgetts RB. The orphan nuclear receptor DHR38 influences transcription of the DOPA decarboxylase gene in epidermal and neural tissues of *Drosophila melanogaster*. *Genome*. 2007 Nov;50(11):1049-60.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takayanagi-Kiya Seika, Shioya Natsumi, Nishiuchi Takumi, Iwami Masafumi, Kiya Taketoshi | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Cell assembly analysis of neural circuits for innate behavior in <i>Drosophila melanogaster</i> using an immediate early gene <i>stripe/egr-1</i> | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2303318120 | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 木矢星歌, 坂本沙紀, 橋本光平, 大村知世, 掛井伶華, 箕口昌杜, 小宮聖十朗, 佐藤翔馬, 坂井貴臣, 岩見雅史, 木矢剛智 |
| 2. 発表標題 タイトル: 神経活動依存的に発現する初期応答遺伝子Hr38/Nr4aはショウジョウバエのドーパミン神経において長期記憶を制御する |
| 3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 木矢星歌, 塩谷捺美, 西内巧, 岩見雅史, 木矢剛智 |
| 2. 発表標題 初期応答遺伝子stripe/egr-1を利用した活動依存的な神経ラベリングを用いたショウジョウバエの生得的行動を制御する細胞集団の解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第94回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|