

## 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 6 月 6 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22700327  
 研究課題名 (和文) ショウジョウバエ嗅覚記憶依存的に発現する遺伝子の解析による記憶分子機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analysis of gene expression changes associated with *Drosophila* olfactory memory formation  
 研究代表者  
 村上 智史 (Satoshi Murakami)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：10463902

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、脳の一部領域に注目した発現解析を行うことにより、これまででない精度で記憶形成に関わる遺伝子を特定することを目指した。具体的にはショウジョウバエ嗅覚記憶中枢 (キノコ体) における遺伝子発現をRNA-seq法により網羅的に解析した。これまでに脳全体における発現解析は行われているが、キノコ体のみでの発現情報はほとんど報告されていない。本研究では得られた発現情報をもとに、定量PCRや*in situ* hybridizationによる発現解析、RNAiを用いた成虫期特異的遺伝子機能阻害を進めた。その結果得られたProspero, Rgk1はほ乳類との相関性が高く、今後、これらの遺伝子について発現解析・変異体解析を進めることにより、高等生物へ一般化できるような記憶形成機構の解明が期待される。

## 研究成果の概要 (英文)：

To obtain novel insights on molecular mechanisms underlying the olfactory memory formation, we performed RNA-seq analysis in a restricted *Drosophila* brain region, the mushroom body (MB), which is a central neuropil for the olfactory memory. The RNA-seq analysis gave a list of genes strongly expressed in the MB and a list of gene expression changes after the olfactory learning. The following Q-PCR analysis revealed the enrichment of *prospero* in the adult MB. RNAi-mediated knockdown of *prospero* in the MB resulted in impaired memory formation. Co-expression of wild-type *prospero* rescued this phenotype, suggesting that MB-expressing *prospero* plays a critical role in the memory formation. I also found very specific expression of *rgk1* in the adult MB. Rgk1 encodes a REM family protein, which is reported to regulate voltage-gated calcium channel in rodents. Since *prospero* and Rgk1 has mammalian homologs, detailed analysis of these genes will lead to the identification of novel and conserved molecular mechanisms underlying the memory formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般 (1101)

キーワード：(A) 分子・細胞神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

記憶形成の分子機構や神経回路については多くのモデル生物を用いて研究がなされ、種を超えて保存された機構の存在が明らかにされてきた。その中で CREB などの転写因子が新規転写を誘導し特定のシナプス間伝達が増強されるという知見が、マウス、アメフラシ(Aplysia)そしてショウジョウバエなどの様々な記憶形態において報告されている。ショウジョウバエにおける記憶依存的転写制御に関する先駆的な研究としては、Dubnau らによるマイクロアレイを用いた記憶形成前後における発現変化解析があり、特定の匂い物質と電気刺激を連合させる嗅覚忌避記憶において、翻訳抑制因子や mRNA 結合因子の転写上昇が確認された。しかしながらこれらの因子はシナプス特異的な転写制御に関わると考えられ、転写活性化とシナプス増強そして記憶形成をつなぐような統一的な分子機構モデルは未完のままである。このようなモデルを策定するためには、記憶形成に関わる重要因子のさらなる特定と、それぞれの因子の記憶形成過程における発現様式と機能の確定が必要と考えられる。

### 2. 研究の目的

ショウジョウバエでは、MARCM 法やカルシウムイメージング法などにより、ごく少数の細胞における神経活動の可視化や遺伝子機能操作を行う系が開発されている。一方で記憶関連遺伝子の探索に関しては、詳細なものでも脳全体をサンプルとした研究に限られている。本研究では、脳の一部領域に注目した発現解析を行うことにより、これま

でにない精度で記憶形成に関わる遺伝子を特定することを目標とした。ショウジョウバエ嗅覚記憶にはキノコ体(Mushroom Body, MB)と呼ばれる脳部位が中心的な働きを持つ考えられている。本研究では、高感度な発現解析法である RNA-seq 法を用いることにより、キノコ体で発現する遺伝子あるいは記憶依存的に発現変動する遺伝子を同定し、さらに個体における同定した遺伝子の発現解析と機能解析を行うことにより、記憶形成に関わる新たな分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) キノコ体微量 RNA からの記憶形成前後における次世代シーケンサー (SOLiD system) を用いた RNA-seq 法による発現解析を行った。キノコ体から抽出した mRNA はごく微量であるため、近年報告された mRNA 増幅法を用いて増幅を行った (Nature protocols, 2010, vol.5, 516-). Total RNA の品質評価は Experion (Bio-rad) を用いて行った。増幅後の cDNA は定量 PCR により linearity をチェックした。嗅覚記憶の誘導には、独自に開発した半自動条件付け装置 (Satoshi Murakami et al., Journal of Neuroscience Methods, 188 (2), 195-204, 2010.) を用いた。

(2) RNA-seq により得られた発現データを解析し、(a) 嗅覚記憶形成前後で高い発現変動を示す遺伝子 (b) キノコ体で強く発現する記憶関連遺伝子を特定した。これらの遺伝子の中から神経活動あるいは記憶形成に働く可能性のある遺伝子について、定量 PCR または *in situ* hybridization 法によ

る発現解析実験を行い、キノコ体における発現を詳細に調べた。

(3) 同定されたキノコ体発現遺伝子について、RNAi を用いてキノコ体特異的遺伝子機能阻害を行い、記憶形成における当該遺伝子の働きを調べた。遺伝子阻害による発生過程への影響を除くために、温度依存的に RNAi を作用させ、記憶形成前後のみで遺伝子機能阻害を行った。具体的には、生体内における外来遺伝子発現系である Gal4/UAS 発現系に対して、転写因子 Gal4 阻害因子 Gal80 の温度感受性 Gal80-ts を用いることにより、温度依存的に目的遺伝子に対する inverted repeat (IR) 配列を発現させた。嗅覚記憶実験では、特定の匂い (3-octanol または methylcyclohexanol) と電気刺激を同時に与える連合学習を行い、一定時間後の匂いに対する忌避度を定量化することにより行った。

#### 4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析の結果、記憶形成後に有意な変動を示す遺伝子のリストを得た。嗅覚忌避学習を受けた個体のキノコ体サンプル n=4 とコントロール n=4 を解析した結果、248 遺伝子が発現上昇、710 遺伝子が発現低下を示した (図 1)。発現上昇が認められる遺伝子の中で *lanB2* 遺伝子の変動が統計的に最も確からしく、*lanB2* 以外の Basement membrane 構成因子 (*papilin*, *lanB1*, *lanA*) も類似の変動を示した。*lanB2* 遺伝子がコードするタンパクのは乳類ホモログについて、シナプスに局在し Neurotransmitter 受容体の細胞内局在を制御しているという知見がある。さらにショウジョウバエ *lanB2* 遺伝子については転写開始点上流 1kb 以内に複数の CREB 結合配列が存在し、培養細胞系において cAMP 依存的に転写誘導が起こることが報告されてい

る。これらのことから、*LanB2* が記憶形成依存的に活性化し、シナプスの構造変化に働いているという仮説が考えられる。

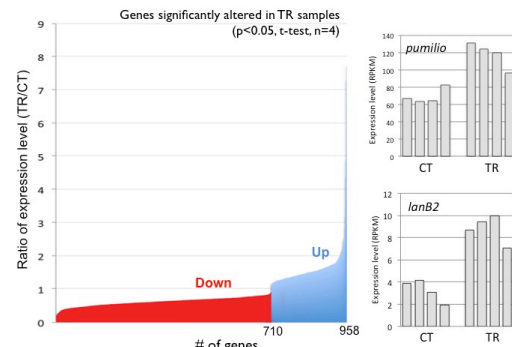


図1 長期記憶条件付けに伴って発現変動する遺伝子

(2) 嗅覚記憶中枢であるキノコ体において高く発現する遺伝子の網羅的リストを得た (図 2)。キノコ体での発現レベルが高い遺伝子の中から、神経活動あるいは記憶形成に関与する可能性のある遺伝子について、定量 PCR により成虫脳における発現を調べた。定量 PCR の結果、*homoeobox* 遺伝子である *prospero* 遺伝子の発現量が脳全体と比較してキノコ体で 3 倍ほど強いことを明らかにした。さらに詳しく調べたところ、*prospero*-RJ isoform が他の isoform と比較してキノコ体で数倍のレベルで発現していることがわかった。*prospero*-RJ は他の isoform と比較して、3' UTR が短い、転写活性において重要な働きをもつ Homeodomain が長い、という特徴を持つ。

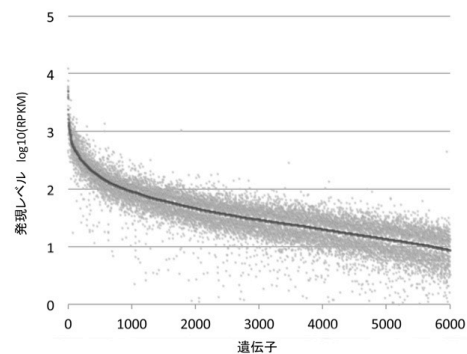


図2 キノコ体で発現する遺伝子を発現レベル順にプロットした

(3) RNA-seq データを元に *in situ*

hybridization 実験を行った。ドメイン構造や既知の知見をもとに候補遺伝子の絞り込みを行い、26 遺伝子に対して mRNA 発現パターンを調べた結果、8 遺伝子がキノコ体において強く発現することがわかった。このうち 6 遺伝子については、これまでに成虫脳における知見は報告されていない。これらの中で、特に REM family に属する *rgk1* 遺伝子がキノコ体で非常に特異的な発現を示した (図 3)。*rgk1* がコードするタンパクは 14-3-3 や Calmodulin など神経細胞で発現する因子と結合しうるドメインを持っており、これらの因子の制御を受けて、神経活動依存的に働く可能性が考えられる。

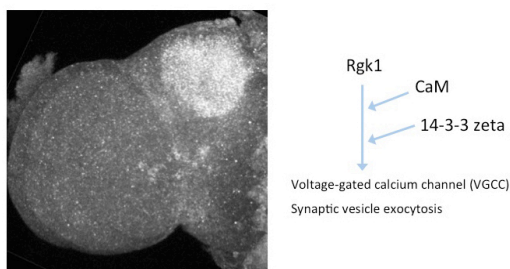


図3 *rgk1* に対する *in situ* hybridization 実験の結果と、予想される Rgk1 の神経活動における機能

(4) 温度依存的にキノコ体特異的に *prospero* に対する inverted repeat (IR) 配列を発現させたところ、制限温度において嗅覚記憶に異常が見られた (図 4)。免疫抗体染色と定量 PCR により、*prospero*-IR を発現したキノコ体で Prospero level が確かに減少していることが確認された (図 5)。さらに *prospero*-IR とともに野生型 *prospero* を発現させて Prospero level を戻したところ、正常な嗅覚記憶を示した。これらの結果から、成虫キノコ体における Prospero が嗅覚記憶形成に重要な働きを持つことが考えられる。

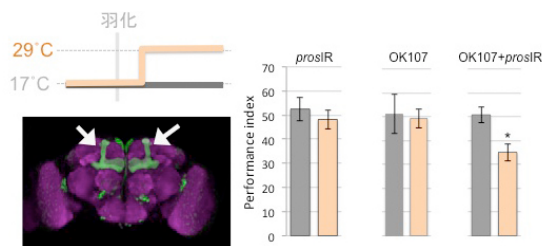


図4 成虫期キノコ体特異的な *prospero* 阻害により記憶形成異常が見られた。矢印=キノコ体。

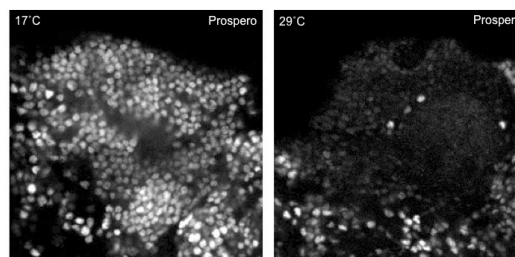


図5 温度依存的な部位特異的 *prospero* 発現阻害の効果 (キノコ体付近の拡大図)

#### まとめ

本研究により、精度の高いキノコ体遺伝子発現情報を得た。これまでに脳全体における発現解析は多くなされているが、キノコ体のみでの網羅的な発現情報は報告されていない。今回同定した遺伝子 *lanB2*, *prospero*, *rgk1* はほ乳類との相同性が高く、ほ乳類記憶中枢での発現 (Prospero ホモログ *prox1* は Dentate gyrus で特に発現が強いという報告がある) や神経活動への関与 (Rgk1 のマウスホモログ REM2 は voltage-gated calcium channel を制御する) を示唆する知見が報告されている。特に *lanB2* のほ乳類ホモログについてはシナプスへの局在や Neurotransmitter channel の局在制御などが報告されており、記憶形成後に *lanB2* 発現が上昇しシナプス活性を modulate するという新たな分子機構モデルが考えられる。いずれの因子についても記憶形成への関与はこれまでに報告されておらず、今後これらの遺伝子について発現解析・変異体解析を進めるこ

とにより、高等生物へ一般化できるような記憶形成機構の解明が期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 8 件)

① Identification of mushroom body-associated neurons that regulate the formation of *Drosophila* olfactory aversive memory

Satoshi Murakami, Kohei Sekiguchi, Kazumichi Shimzu, Yuko Maeyama, Tetsuya Tabata

新学術領域班会議「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」、東京  
2010年11月8-9日

② Transcriptome analysis of olfactory aversive memory in *Drosophila* mushroom body

Satoshi Murakami, Maki Minami, Yuko Maeyama, Yutaka Suzuki, Tetsuya Tabata

第33回日本分子生物学会年会、兵庫

2010年12月7日

③ Genes activated after the olfactory aversive conditioning in *Drosophila* mushroom body

Satoshi Murakami, Maki Minami, Tetsuya Tabata

第4回グローバルCOEリトリート、山梨

2011年3月5-6日

④ RNA-seq analysis of *Drosophila* mushroom body transcripts and the mutant analysis with olfactory aversive learning paradigm

村上智史、大坪真樹、白髭克彦、多羽田哲也  
新学術領域班会議「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」、大阪

2011年8月20-21日

⑤ Olfactory memory mutant analysis based on RNA-seq analysis of the *Drosophila* mushroom body

Satoshi Murakami, Maki Otsubo, Katsuhiko Shirahige, Yutaka Suzuki, Tetsuya Tabata

第34回日本分子生物学会年会、兵庫

2011年12月13日

⑥ Learning-induced neural plasticity in

*Drosophila* at a single cell level  
Makoto Hiroi, Daisuke Yamazaki, Satoshi Murakami, Tetsuya Tabata

第34回日本分子生物学会年会、兵庫

2011年12月13日

⑦ Olfactory memory mutant analysis based on RNA-seq analysis of the *Drosophila* mushroom body

村上智史、大坪真樹、鈴木穰、白髭克彦、多羽田哲也

新学術領域研究『生命科学系3分野支援活動』ゲノム支援拡大班会議、大阪

2011年12月17-18日

⑧ Olfactory memory mutant analysis based on RNA-seq analysis of the *Drosophila* mushroom body

Satoshi Murakami, Maki Otsubo, Katsuhiko Shirahige, Tetsuya Tabata

第4回グローバルCOEリトリート、山梨

2012年3月3-4日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上智史 (Satoshi Murakami)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10463902