

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 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800012

研究課題名（和文）ショウジョウバエのキノコ体における記憶形成依存的なプロテオミクス解析

研究課題名（英文） Functional proteomic analysis to identify memory formation-related proteins in the Drosophila mushroom bodies.

研究代表者

山崎 大介 (Daisuke Yamazaki)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80588377

研究成果の概要（和文）：本研究ではショウジョウバエを用いて記憶の形成・維持・読み出しができる仕組みを分子レベルあるいは細胞レベルで説明するための新たな解析手法の開発に取り組んだ。当初の予定ではプロテオミクス解析による新規な記憶形成関連タンパク質の同定し、それらがどの細胞においていつ機能するかを解析するのが目的であったが、プロテオミクス解析において技術的にクリアできない点があったため、別の手法を利用して記憶をコードする細胞の同定からアプローチすることとした。その結果、CREB 活性をモニターできる CREB レポーターフライを作製し、長期記憶形成時に CREB が活性化される細胞のマッピングに成功した。

研究成果の概要（英文）：I started to develop the new methods to approach the molecular or cellular mechanisms underlying memory formation, storage, retrieval in this study. I tried to identify new factors related to learning and memory by proteomics analysis and then, I planed to determine the cells in which they would function. But I failed to establish the methods to concentrate the synapse-specific proteins. So I changed my approach into identify the cells recruited into memory traces. I generated CREB activity reporter flies and succeeded in labeling the cells in response to long-term 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	1260000	378000	1638000
2011 年度	1160000	348000	1508000
年度			
年度			
年度			
総計	2420000	726000	3146000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：記憶学習、ショウジョウバエ、プロテオミクス、CREB

1. 研究開始当初の背景

記憶学習に必要な因子群はショウジョウバエにおいては既に50個ほど同定されているが、それらがいつ、どの細胞でどのように機能することで記憶の形成・維持・読み出しができるのかについては未だに不明な点が多い。ショウジョウバエで同定されている記憶学習関連因子は哺乳類と共通のものが多く、ショウジョウバエで得られた知見が哺乳類の研究にも還元できる可能性が高い。また、遺伝学的手法が発達しているため、それらの詳細な解析も可能である。さらに最近ではライブイメージングの実験系も構築されてきており、顕微鏡下で記憶形成した個体を使って分子動態を観察することも可能となっている。

2. 研究の目的

記憶のメカニズムを分子・細胞レベルで理解するためには、新たな学習記憶関連因子の同定と、それらが実際に機能し、記憶をコードする細胞の同定が必要不可欠である。本研究はこの2つの課題をクリアするための新たな手法の開発を通じて記憶学習のメカニズムへと迫るものである。新規因子により記憶学習の分子メカニズムに新たな知見を与えること、またライブイメージングに利用できるプローブの選択肢の多様化が期待された。記憶細胞の同定に関しては、ライブイメージングの際に観察すべき細胞に関して新たな知見を与えることが期待された。

3. 研究の方法

新規記憶学習因子の同定に関しては、ショウジョウバエの頭部を大量に用意し、そこからシナプトソーム画分を調製することでシナプスのタンパク質をある程度濃縮することを想定していた。本実験ではさらにショウジョウバエの記憶中枢であるキノコ体においてタンデムアフィニティータグを発現させることによりキノコ体を細胞外ラベルし、そのハエのシナプトソーム画分からキノコ体のシナプスタンパク質をアフィニティー精製するという手法を提案した。このサンプルを定量プロテオミクス解析により記憶形成個体とコントロール郡とで比較することで記憶学習に関連する因子群の同定を計画していた。

また、記憶をコードする細胞の同定のためには長期記憶形成に必須の転写因子であるCREBの結合配列(CRE配列)の下流にレポーター遺伝子をつないだコンストラクトから

トランスジェニックフライを作製し、実際にCREBの活性をモニターできるか否か、また長期記憶依存的にレポーター遺伝子の発現が見られるか否かを調べることにした。

4. 研究成果

キノコ体を細胞外ラベルするため、マウスCD8タンパク質の細胞外ドメインに、FLAGエピトープをタンデムにつないだキメラタンパク質を発現するトランスジェニックフライを作製した。キノコ体細胞を単離する前処理として、哺乳類で用いられるようなシナプトソーム画分の調製をハエでも試みたところ、ハエでは特に可溶性シナプスタンパク質の濃縮をすることは困難であることがわかった。一方、膜タンパク質の濃縮については可能であることが分かったが、プロテオミクス解析をするためには可溶性タンパク質の混入を下げる方法が必要であることも分かり、プロテオミクス解析するには至らなかった。

もう一つの課題として、記憶をコードする細胞の同定へと着手した。長期記憶ではCREBによる転写・翻訳が必須である。これに着目し、CRE配列(CREB結合配列)の下流にレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを作製し、これを導入したトランスジェニックフライを作製した。このレポーターフライを用いて、まずこのハエが本当にCREBの活性をモニターしているかどうかを調べた。Forskolin / IBMX処理によりCREBの上流であるcAMP/PKA経路を活性化すると、キノコ体においてレポーター活性の強い応答が見られた。また、CREBのdominant-negative formの発現させた個体や、CRE配列に変異を導入したレポーターではこの応答が消失したことから、作製したレポーターは内在性CREBの活性をモニターしていることが示唆された。次に、CRE配列の下流にGeneSwitch遺伝子をつないだレポーターフライ(CRE-GeneSwitch)を作製した。GeneSwitchは改変型GAL4転写因子であり、RU486存在下でのみ転写活性をもつことで知られる。CRE-GeneSwitch系統と既存のトランスジェニック系統(UAS系統)と掛け合わせることでRU486をハエに食べさせたときにのみCREB活性化細胞において目的遺伝子が発現させることが可能となった。UAS系統としてUAS-shibire^{ts}系統を利用することにより、RU486を与えたときにのみCREB活性化細胞の神経活動を温度依存的に阻害することができ、これらの細胞が記憶にどのように関わっ

ているかを明らかにすることができる。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Daisuke Yamazaki, Junjiro Horiuchi, Tomoyuki Miyashita, Minoru Saitoe

Acute Inhibition of PKA Activity at Old Ages Ameliorates Age-Related Memory Impairment in *Drosophila*.

Journal of Neuroscience, 2010, 30 (46) 15573-15577. (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

Daisuke Yamazaki, Makoto Hiroi, Toshiharu Ichinose, Tetsuya Tabata.

Long-term memory formation-dependent changes of CREB reporter signals in *Drosophila*.

日本分子生物学会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 大介 (Yamazaki Daisuke)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号 : 80588377

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし