

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650198

研究課題名（和文） グリアー神経乳酸シャトルによる記憶形成と脳老化調節機構の解明

研究課題名（英文） The role of glia-neuronal lactate shuttle in brain aging

研究代表者

齊藤 実 (SAITOE MINORU)

公益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）：

加齢性記憶障害は脳老化の重要な指標であり、ショウジョウバエではグリアにあるミトコンドリアタンパクのピルビン酸カルボキシラーゼ(PC)活性が、加齢に伴い上昇することが原因の一つである。本研究では「PCの活性上昇に伴うグリアー神経乳酸シャトル(GNLS)の抑制が記憶障害の原因である」との仮説を立て検証を試みたが、仮説を十分に実証する証拠は得られなかった。PCの活性上昇はオキサロ酢酸とオキサロ酢酸から産生されるアスパラギン酸の生合成を上昇させる。これら化合物はD-セリンを産生するセリンラセマーゼ(SR)を阻害する。そこで老齢体でD-セリンレベルを調べたところ、顕著な低下がみられた。またPCの過剰発現体でもD-セリンレベルの低下がみられ、さらに老齢体、PC過剰発現体いずれの記憶障害もD-セリン摂取により改善された。D-セリンはグリア由来のNMDA受容体アゴニストであり、学習記憶に関連したシナプス可塑性の発現に必須の役割を担っている。以上の結果から加齢によりPC活性が上昇したことでSR活性が阻害され、D-セリン合成が低下したことが記憶障害の原因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 and caused by age-related increase in pyruvate carboxylase (PC), a mitochondrial anaplerotic enzyme, in *Drosophila*. As increase in PC may suppress synthesis of lactate, glia-derived energy source for neurons, in this study, we tried to demonstrate that increase in PC activity inhibits glia-neuron lactate shuttle (GNLS) thereby impairs memory formation. However, our behavioral and biochemical data demonstrated that PC-dependent memory defects are not caused by GNLS inhibition. Although increase in PC activity does not inhibit GNLS, it may inhibit serine racemase (SR) via increasing biosynthesis of its potent inhibitors oxaloacetate (OAA) and aspartate (Asp). SR converts L-serine to D-serine, a glia-derived NMDA receptor agonist. As we expected, D-serine/L-serine ratio is significantly decreased in aged AMI-suffered flies, and this decrease is suppressed by *dPC* mutations. Furthermore, both AMI and memory defects caused by overexpressing PC in glia are ameliorated by feeding flies D-serine. We propose that 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
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：老化、学習記憶、ショウジョウバエ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、D-セリン

### 1. 研究開始当初の背景

*DCO* 遺伝子によりコードされる PKA 触媒部位のショウジョウバエのヘテロ変異体 *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(PC)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。PC はミトコンドリアタンパクであり、ピルビン酸(PA)からオキサロ酢酸(OAA)を合成し、TCA回路に供給する。哺乳類の脳ではグリア細胞に発現し、神経細胞には発現していない。

### 2. 研究の目的

PC の基質である PA は OAA に変換されるのみならず、乳酸脱水素酵素(LDH)により乳酸にも変換される。従って PC 活性が上昇すると、LDH の基質として働く PA の低下、さらには乳酸の酸性低下が予想される。乳酸はグリア由来の神経エネルギー源であり、近年記憶形成における重要性が報告されたところである。本研究では乳酸合成の低下を中心として、PC の活性上昇が何故記憶障害を引き起こすのか？を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエ系統

*dPC/+* 変異系統、LDH 変異系統、乳酸トランスporter MCT1 変異系統に加えて、グリア細胞特異的な GAL4 発現系統、神経細胞特異的な GAL4 系統に各種 UAS-トランスジーン系統、RNAi 系統を用いて、生化学、行動解析を行なった。

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。

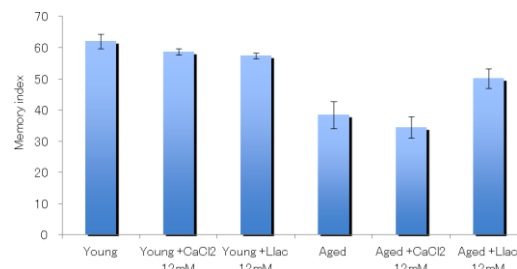
### 乳酸・D-セリンの定量

水中単離した脳をホモジナイズ後上澄をサンプリングし、高速液体クロマトグラフィーと蛍光分光計を組み合わせたセットアップにより乳酸、D-セリン、L-セリンの定量を行なった。

### 4. 研究成果

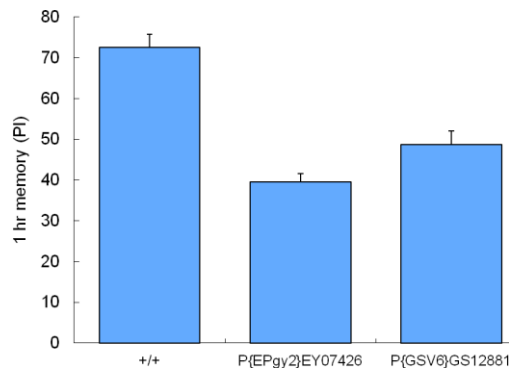
#### (1) PC 活性上昇と乳酸産生の相関

もし PC の活性上昇により乳酸の産生低下が起こることが記憶を障害するのであれば、乳酸を補填することにより記憶障害が改善する可能性がある。そこで加齢体に 12 mM の乳酸を三日間摂取させた後に記憶テストを行なった。その結果、乳酸摂取群の加齢体では顕著な記憶改善がみられた(下図)

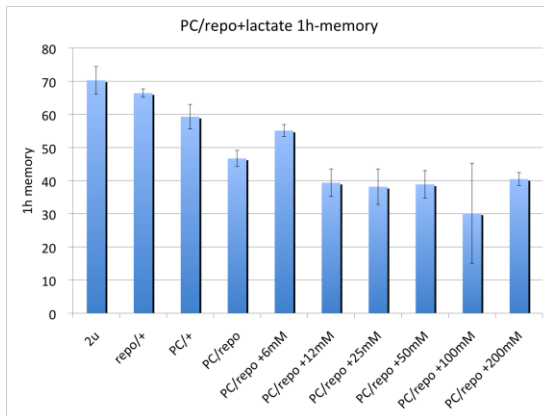


また乳酸の合成が低下することで記憶障害が起こるのであれば、乳酸合成酵素 LDH の機能低下変異体で記憶障害が予想される。そこで LDH の変異体で記憶テストを行なった。その結果 LDH 変異体の 2 系統いずれでも記

憶障害がみられた(下図)。



では PC の活性上昇により乳酸が低下するのか? 加齢体と dPC の過剰発現体の脳で乳酸レベルを調べた。加齢体では乳酸レベルが寧ろ増加していること、また dPC の過剰発現体でも同様に乳酸レベルが増加していることを見出した。さらに加齢性記憶障害が抑制されている DC0/+変異体の加齢体は野生型加齢体と変わらない乳酸レベルであり、dPC の過剰発現体でみられる記憶障害は乳酸を摂取させても改善しなかった(下図)。

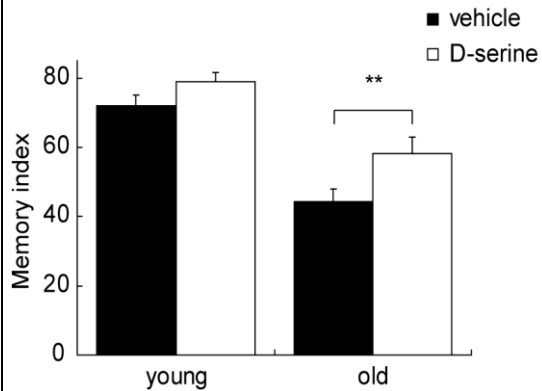


図説 PC をグリア特異的に過剰発現させた系統 PC/repo でみられる記憶障害は乳酸摂取により改善されなかった。

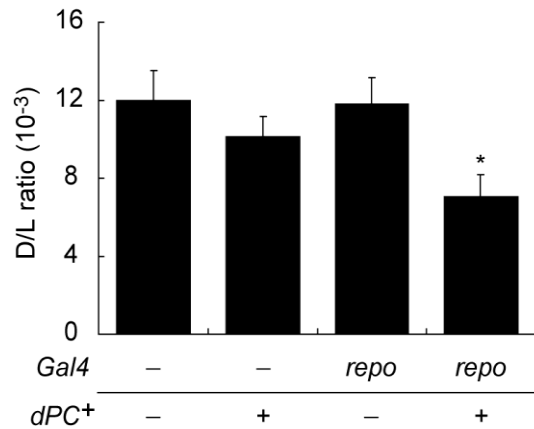
(2) PC による D-セリン産生の低下:

D-セリンは、シナプス可塑性に重要な役割を果たすことが知られている、グリア由来の NMDA 受容体アゴニストであり、セリンラセマーゼ(SR)により L-セリンからのラセミ変位により合成される。ピルビン酸から PC により合成される OAA は TCA 回路に取り込まれるだけで無く、さらにアスパラギン酸(Asp)へと変換する。OAA、Asp いずれも内因性の SR 阻害剤としての効果を持つことが知られている。そこで加齢に伴う PC の活性上昇が D-セリン産生を低下させ、その結果記憶が障害された可能性がある。そこでこの可能性を調べるため、先ず老齢脳で D-セリンレベルが低下してい

るか調べたところ、顕著な低下がみられ、この低下が加齢性記憶障害が抑制されている PC/+変異体では抑えられていた。また加齢体に D-セリンを摂取させると記憶が顕著に改善された(下図)。

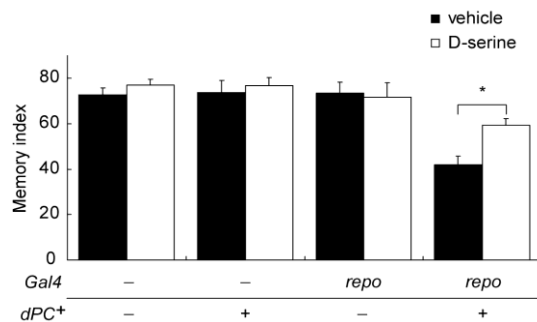


また dPC の過剰発現により D-セリンレベルが低下するか調べたところ、顕著な低下がみられた(下図)。



図説 dPC を repo-GAL4 によりグリア細胞特異的に発現させ、セリンの D 体/L 体比を調べた。

加えて dPC の過剰発現による記憶障害も D-セリン摂取により改善された(下図)。



以上の結果から、加齢性記憶障害は加齢により PC 活性が上昇して SR 活性を抑え、D-セリン産生を低下させることが原因であるこ

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 7 件)

1. 平野恭敬、齊藤 実 (2013). 記憶改善に向けた新たな進展: 軽度の空腹状態は長期記憶形成を促進する 細胞工学 32, 452-453. 査読無
2. Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Fasting Launches CRTC to Facilitate Long-term Memory Formation in *Drosophila*. *Science* 339, 443-446. 査読有
3. Ueno, K, Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., and Saitoe M. (2013). Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain. *J. Physiol.* 591, 287-302. 査読有
4. Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M., Maeda N (2013). Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 200, 219-233. 査読有
5. Miyashita, T., Oda, Y., Horiuchi, J., Yin, J.C., Morimoto, T., and Saitoe M. (2012). Mg<sup>2+</sup> block of *Drosophila* NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression. *Neuron* 74, 887-898. 査読有
6. Naganos, S., Horiuchi, J., and Saitoe, M. (2012). Mutations in the *Drosophila* insulin receptor substrate, CHICO, impair olfactory associative learning. *Neurosci. Res.* 73, 49-55. 査読有
7. Hirano, Y., Kuriyama, Y., Miyashita, T., Horiuchi, J., and 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

[学会発表] (計 19 件)

1. 宮下知之、齊藤 実 The rest interval dependent MAPK activation forms and sustains c-fos and CREB transcriptional cycling required for long-term memory. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「遺伝子発現とタンパク質分解によって産み出される記憶制御のダイナミクス」、2012 年 12 月 11 日、福岡
2. Ueno K, Saitoe M. Long-term enhancement in the mushroom body in cultured *Drosophila* brain: Cellular substrate for olfactory learning. *International symposium on organization and function of the nervous system*, 2012 年 11 月 27 日、東京
3. 上野耕平、亀谷富由樹、長谷川成人、齊藤 実 神経可塑性に伴うリン酸化プロファイルの網羅的解析 日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
4. 神村圭亮、上野耕平、中川 淳、齊藤 実、前田信明 ショウジョウバエの神経筋接合部の形成においてパールカンは Wnt の双方向性シグナルを調節する 日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋
5. 松野元美、齊藤 実 長期記憶形成に必要な神経-グリア相互作用 日本神経科学大会シンポジウム「個々の神経細胞の働きを俯瞰して見る脳機能」、2012 年 9 月 19 日、名古屋
6. 長野慎太郎、上野耕平、齊藤 実 ショウジョウバエの匂い連合学習で形成される 2 種類の記憶成分 日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋
7. 平野恭敬、齊藤 実、長野慎太郎、松野元美、上野耕平、宮下知之、堀内純二郎 ショウジョウバエにおいて飢餓は、CREB/CRTC 経路の活性化により長期記憶形成を促進する 日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋
8. 宮下知之、齊藤 実 活性型 CREB と抑制型 CREB の比を調節するメカニズム 日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋

9. Hirano Y, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Food deprivation facilitates long-term memory formation through activation of the CREB co-activator, CRTC in *Drosophila*. in *Neurofly*, 2012年9月5日、Padua, Italy
  10. 齊藤 実、平野恭敬 食事制限による非特異的な長期記憶促進効果とその分子機構 包括脳ワークショップ公開班会議、2012年7月26日、仙台
  11. 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、2011年12月13日、横浜
  12. 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、2011年12月13日、横浜
  13. 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、2011年11月11日、東京
  14. Ueno K, Naganos S, Saitoe M. Learning-related synaptic plasticity in the *Drosophila* mushroom bodies require correlated activation of NMDA, acetylcholine and dopamine D1 receptors. in *Neurobiology of Drosophila*, 2011年10月6日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
  15. Hirano Y, Saitoe M. Maintenance of long-term memory requires persistent regulation of gene expression. in *Neurobiology of Drosophila*, 2011年10月4日、Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
  16. 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、2011年9月17日、横浜
  17. 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、2011年9月15日、横浜
  18. 松野元美、齊藤 実 Neuron-glia interaction via *Drosophila* CAM Klinglein modulates Repo-mediated glial gene expression required for long-term memory formation. 第34回日本神経科学学会、2011年9月15日、横浜
  19. Saitoe M. Regulation of *Drosophila* age-related memory impairment by glial cells. in *Learning and Memory: A Synthesis of Flies and Honeybees* Janelia Farm HHMI Conference、2011年5月16日、Janelia Farm Research Campus, VA, USA
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
齊藤 実 (SAITOE MINORU)  
 公益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  
 堀内 純二郎 (HORIUCHI JUNJIRO)  
 首都大学東京・理工学研究科・准教授  
 研究者番号：80392364