

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700310

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける記憶細胞の同定と解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of memory-encoded cells in Drosophila

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：記憶情報をコードする細胞の同定を目指し、長期記憶に必須な転写因子であるCREBに着目してCREBレポーター遺伝子を設計し、これを持つショウジョウバエを作製した。このレポーターはショウジョウバエの記憶中枢であるキノコ体の細胞を顕著にラベルすることが解り、その中の細胞が記憶の全過程で重要であることを発見した。これまでCREBは長期記憶に必須の因子であることが言われてきたが、CREBが活性化する細胞は短期記憶にも重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：CREB is an essential transcriptional factor for long-term memory. We constructed some types of CREB reporter genes and generated CREB reporter flies. We found that these reporters strongly labeled the mushroom bodies, central structures for olfactory learning and memory. As the result of functional analysis of these neurons, output from gamma neurons in the mushroom bodies are indispensable for not only long-term memory, but short-term memory at any steps. It has been shown that CREB would have a role only in long-term memory, because long-term memory requires de novo protein synthesis. However, CREB-activated cells seem to be also involved in short-term memory.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：CREB 記憶 ショウジョウバエ キノコ体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類からショウジョウバエに至るまで、長期記憶の形成には転写因子 CREB を介した新規のタンパク質合成が必要である。CREB を強制発現した細胞では記憶がコードされやすいということが近年になって明らかになったのだが、内在性の CREB の活性が実際に記憶のコードの決定因子になっているのか、また、その活性化パターンがどのようになっているのかは不明であった。以前の自身の研究で CREB レポーターコンストラクト(CRE-GFP-CL1)を持つトランスジェニックフライを作製しており、そのレポーターシグナルはショウジョウバエの記憶中枢であるキノコ体において、長期記憶形成依存的な増加を示すことを見いだしていた。実際にレポーターによってラベルされるこれらのキノコ体の細胞群が記憶学習にどのように関与しているのかがその後の研究の焦点となっていた。

2. 研究の目的

CREB レポーターによってラベルされる細胞群が記憶学習の過程においてどのような機能を持っているのかを調べることを本研究の目的とした。レポーター陽性細胞を活性化または不活性化するため、既存のトランスジェニックシステムを利用可能にする新たな CRE-GAL4, CRE-p65AD, CRE-GeneSwitch 系統を作製した。このレポーターを用いて CREB レポーター陽性細胞において温度感受性 *shibire^{ts}* 遺伝子や *TrpA1* などを発現することで、レポーターがラベルした細胞の神経活動をコントロールすることが可能となり、レポーター陽性細胞の記憶学習における機能解析を行う。

3. 研究の方法

新たな 3 種のレポーターはいずれも既存の GAL4/UAS システムを利用するためのものであるが、それぞれ以下のような異なった特徴を持つ。

CRE-GAL4 系統；キノコ体の内外を問わず、CREB 活性化細胞で GAL4 遺伝子を発現する系統。

CRE-p65AD 系統；ヒト由来 p65 遺伝子の活性化ドメインを CREB 活性化細胞で発現させる系統。これと GAL4 遺伝子の DNA 結合ドメインを特定の部位で発現するトランスジェニックフライを組み合わせることで目的遺伝子の発現を CREB レポーターの一部に絞り込むことが可能である。

CRE-GeneSwitch 系統；GeneSwitch は薬剤 RU486 依存的に活性化される改変型 GAL4 タンパク質であり、目的遺伝子の発現時期をコントロールする際に有用である。これを CRE 配列の下流につなげることにより、目的遺伝子の発現期における発現を抑制することが可能である。

これらの 3 種のレポーターを用いて主に温度依存的に神経伝達物質の放出を抑制する *shibire^{ts}* 遺伝子を CREB レポーター陽性細胞で発現させ、どの細胞が記憶学習のどの過程で必要になっているのかを行動実験によって調べた。

4. 研究成果

研究開始当初、CRE-GFP-CL1 で長期記憶依存的にラベルされた細胞群の記憶学習における機能解析を目的としていた。CRE-GFP-CL1 系統で用いている CL1 配列はタンパク質分解促進配列であり、記憶形成前の CREB 活性によるレポーターシグナルを抑制するために付与したものであった。実際に CRE-GAL4 系統を作製して GFP を発現させたところ、記憶形成をしていない個体であっても非常に強いレポーターシグナルが脳全体で

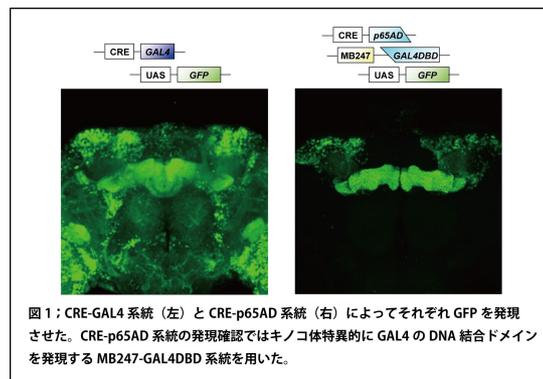


図 1：CRE-GAL4 系統（左）と CRE-p65AD 系統（右）によってそれぞれ GFP を発現させた。CRE-p65AD 系統の発現確認ではキノコ体特異的に GAL4 の DNA 結合ドメインを発現する MB247-GAL4DBD 系統を用いた。

観察された（図 1、左図）。

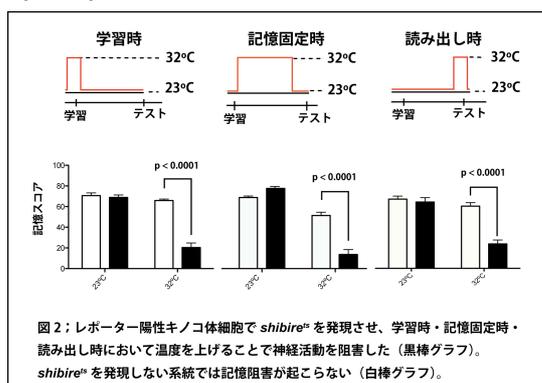
新規の 3 系統のレポーターについても分解促進配列を付与したものを作製し、UAS 系統と組み合わせて長期記憶形成依存的なトランスジーンを発現を試みたが、レポーター系統、UAS 系統ともに分解促進配列を付与しなければ長期記憶形成依存的な細胞のラベルは実現できないということが解った。発現系の全てに分解促進配列を付与するということは長期記憶の測定時（24 時間後以降）にはトランスジーンが発現が非常に低く抑えられてしまうことを意味するため、長期記憶形成後にラベルされる細胞に絞った機能解析は事実上難しいことが明らかになった。こうした結果を受け、記憶形成前後にレポーターにラベルされる細胞の区別をせず、レポーターがラベルする細胞そのものの機能解析することに研究をシフトした。

匂いと電気ショックによる連合学習の実験

系を用いて CREB レポーター陽性細胞のうちの細胞が記憶に重要な役割を担っているかを評価した。CREB は長期記憶に必須の因子として知られているため、レポーター陽性細胞は長期記憶のコードに重要だと考えられた。実際に CRE-GAL4 系統を用いてレポーター陽性細胞で *shibire^{ts}* を発現させたハエで長期記憶形成後、記憶の固定化あるいは記憶の読み出し時にヒートショックをし、神経伝達物質の放出を時期特異的に抑制したところ、どちらの場合も長期記憶が阻害された。この実験を CRE-*p65AD* とキノコ体特異的に GAL4 の DNA 結合ドメインを発現する系統 MB247-*GAL4DBD*

を用いて (図 1、右図) *shibire^{ts}* の発現をキノコ体だけに限局した場合にも同様の結果が得られた。すなわち、レポーター陽性キノコ体細胞の出力が長期記憶の固定化・読み出しのステップで重要だということが示唆された。

CREB は長期記憶にのみ重要だと言われているが、CREB レポーターがラベルする細胞では上流因子であり、短期記憶に必須な cAMP/PKA シグナルが活性化されていると考えられる。従って、レポーター陽性細胞は短期記憶においても重要な役割を担っている可能性があると考え、レポーター陽性細胞での *shibire^{ts}* 遺伝子の発現の影響を短期記憶についても調べることにした。短期記憶の場合においても、記憶の獲得・固定化・読み出しといった全てのステップでレポーター陽性キノコ体細胞の出力が必須であることを見いだした (図 2)



短期記憶・長期記憶に関わらず、また記憶の獲得・固定化・読み出しの全ての過程で必要となる細胞群はこれまでに例が無く、CREB レポーター陽性キノコ体細胞群は記憶学習において中心的な役割を持つことが予想される。興味深いことに、MB247-*GAL4DBD* 系統と同じキノコ体特異的エンハンサー配列を用いてキノコ体全体で *shibire^{ts}* を発現させたとしても全てのステップでの記憶障害は見られない。それは他の既存のエンハンサー・トラップ系統に関しても同様であった。こ

のことは得られた表現型が CREB レポーターのキノコ体における発現パターンに依存しているということを意味する。これを検証するため、CRE-GAL4 系統で *shibire^{ts}* を発現させて見られる記憶障害の表現型が、他の GAL4 系統と共存させることで回復されるかどうかを試みた。つまり CREB レポーターのラベリングパターンを別の GAL4 系統で乱したときの影響を観察したところ、*shibire^{ts}* の発現量が増加しているにもかかわらず、短期記憶の獲得・固定化・読み出しの全ての障害から回復が見られた。また、CREB レポーターが GAL4 の阻害因子である *GAL80* 遺伝子を CRE 配列の下流に繋げた系統 CRE-*GAL80* を作製し、既存のエンハンサー・トラップ系統で *shibire^{ts}* を発現したときに得られる表現型が CRE-*GAL80* によって回復できるかどうかを試みた。キノコ体全体で *shibire^{ts}* を発現させた場合、短期記憶の読み出しにおける障害が見られるが、この表現型は CRE-*GAL80* によって回復しないということがわかった。すなわち短期記憶の読み出しに関してはキノコ体の CREB レポーター陽性細胞だけが重要なのではなく、レポーター陰性細胞も重要であることが示唆された。CRE-*GAL80* によってエンハンサー・トラップ系統によるキノコ体における遺伝子発現の大部分は消失してしまうのだが、このことはエンハンサー・トラップ系統と CREB レポーターのラベルする細胞が共通部分を多く持つが、この共通部分での CREB の活性化パターンが重要な役割に担っていると考えられる。今後はこの CREB レポーター特異的な発現パターンが分子あるいは回路のレベルでどういった意味を持つのかについて、ライブイメージングを用いて明らかにしていく。

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0件)

[学会発表](計2件)

1. 山崎大介、多羽田哲也

Memory traces in *Drosophila* revealed by CREB-dependent reporter gene expression
2012年9月19日 日本神経科学学会大会(名古屋)、口頭発表

2. 山崎大介、廣井誠、市之瀬敏晴、大坪-南真樹、多羽田哲也

Functional analyses of CREB-reporter-positive mushroom body neurons
2013年12月4日 日本分子生物学会年会(神戸)

ポスター発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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