

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700415

研究課題名(和文) グリアで起こる長期記憶関連遺伝子の発現とそれを制御する神経・グリア相互作用の解析

研究課題名(英文) The molecular mechanisms underlying neuron-glia interaction during long-term memory formation

研究代表者

松野 元美 (MATSUNO, Motomi)

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・主席研究員

研究者番号：90392365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：記憶形成に必要な神経・グリア相互作用の分子機構は不明である。私達は既に、細胞接着因子Klignon (Klg)は神経とグリア細胞に発現し、Klgを介した神経・グリア相互作用の増加が長期記憶形成に必要であり、Klgが長期記憶形成に必要なグリア遺伝子の発現調節をすることを見だしている。今回私達は長期記憶形成時に必要なKlgを介した神経・グリア回路をショウジョウバエ脳内で明らかにし、Klgを介した神経・グリア相互作用が長期記憶学習後に転写因子Repoを増加させることを示した。さらに私達はRepoによるグリア遺伝子発現が長期記憶学習後の細胞死抑制に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms underlying neuron-glia interaction during memory formation are poorly understood. Previously we discovered that a cell adhesion molecule, Klignon (Klg), is expressed in both neurons and glia, and a training-dependent increase in Klg-mediated neuron-glia interactions is required to form long-term memory (LTM). We also found that Klg modulates glial gene expression, which is required for LTM formation. In this study we identified a novel mechanism for glial regulation of LTM formation. We determined that Klg mediates interactions between specific types of neurons and glia, and found that these interactions increase expression of a glial transcription factor, Repo. Repo, in turn, activates a glial gene expression that functions to prevent LTM-induced cell death.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：グリア ショウジョウバエ 長期記憶 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

近年、グリアが学習記憶など脳高次機能の発現に積極的に関与することが明らかになっている。しかし記憶形成に必要な神経・グリア相互作用やそれを担う分子機構はまだ不明な点が多い。私達はショウジョウバエのホモフィリック細胞接着因子 Klingleon (Klg) が長期記憶形成に重要であり、発現量が長期記憶形成時に Notch シグナル依存性に増加すること、Klg は神経、グリア両細胞に発現し、それらの接合部に局在することを見出している。どちらの細胞で Klg の発現をノックダウンしても長期記憶が特異的に悪くなることから、Klg を介した神経・グリア相互作用が長期記憶形成に重要であることが示唆された。また長期記憶形成時、グリア特異的な転写因子、Repo の発現増加が生じること、さらに Klg 変異により Repo 発現が減少することも見出している。長期記憶形成過程では神経細胞で CREB などの転写因子を介した遺伝子発現が必要である。対して私達の結果は長期記憶形成時、グリアでも遺伝子発現が起こること、それは転写因子 Repo 依存性であり、転写活性上昇には Klg を介した神経・グリア相互作用が必要である可能性を示唆している。本研究ではこの Klg から Repo 依存性の長期記憶関連遺伝子発現に至る経路を立証し、長期記憶形成時の神経・グリア相互作用の実体、その結果どのような遺伝子の発現がグリアで引き起こされるかを明らかにし、「神経・グリア相互作用による長期記憶形成機構」という新規概念を確立することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究は以下の5点を明らかにすることで「長期記憶学習 Klg を介した神経・グリア相互作用の増加 グリア細胞での Repo 依存性遺伝子発現の上昇 長期記憶形成」という長期記憶形成経路を立証し、神経・グリア相互作用を介したグリアによる長期記憶形成

制御という新規メカニズムを確立することを目的とした。

- (1) 長期記憶形成時の Klg を介した神経・グリア相互作用は脳内のどこで必要か？
- (2) グリア特異的転写因子 Repo は長期記憶形成過程で必要であるか？
- (3) 長期記憶形成学習による Repo の発現増加は Klg を介した神経・グリア相互作用依存性か？
- (4) Repo は Klg 依存性の長期記憶形成に必要か？
- (5) 長期記憶形成時、Repo はどのようなターゲット遺伝子の発現制御をするのか？

### 3. 研究の方法

長期記憶学習後の Klg を介した神経・グリア相互作用と Repo 依存性のグリア遺伝子発現について明らかにするため、行動解析および分子生物学、生化学的解析を行った。

行動解析ではショウジョウバエに匂いと電気ショックを用いた連合学習を行わせ、記憶を定量化した。

ショウジョウバエの長期記憶はトレーニングを15分の間隔をあけて繰り返し行うことで (spaced training) 作られることがわかっている。一方、間隔なしの繰り返し学習 (massed training) では遺伝子発現やタンパク合成によらない麻酔耐性記憶が作られる。このように異なる記憶を生み出すトレーニング方法を使い分け、記憶を調べた。また、長期記憶学習後の遺伝子発現やタンパク合成については Q-PCR および Western blotting を用いて解析を行った。

### 4. 研究成果

- (1) 脳内のどの領域で Klg を介した神経・グリア相互作用が起こることが、長期記憶形成に必要なか？ GAL4/UAS 遺伝子発現システムを用いて、脳の細胞種特異的に Klg-RNAi を発現させることで Klg をノックダウンし、長期記憶行動を解析した。その結果、グルタミン

酸作動性神経/ドーパミン作動性神経とアストロサイトグリア間のKlgを介した相互作用が長期記憶形成に重要であることが明らかになった。

(2) Repo は発生の時期にも必要であるため、Repo を介した転写制御が成虫の長期記憶形成過程に必要なか行動レベルで確認した。repo RNAi またはドミナントネガティブ型 repo (転写活性化ドメインを欠いている) の学習直前の強制発現による急性ノックダウンはどちらも長期記憶障害を引き起こすことを見いだした。このことから、長期記憶形成には Repo 依存性のグリアの遺伝子発現が必要であることが示唆された。

(3)「長期記憶形成過程でKlgを介した神経・グリア相互作用が生じ、その結果 Repo が増加する」という仮説についてテストするため、klg 変異体や klg の細胞種特異的なノックダウン個体を長期記憶学習させ、学習後の Repo 発現変化を調べた。その結果、野生型では学習後に Repo の発現は有意に増加していくのに対し、このような増加は klg 変異体や klg の細胞種特異的なノックダウン個体では抑制されることが示された。この結果は、長期記憶学習後の Repo の増加には Klg を介した神経・グリア相互作用が必要であることを示唆している。

(4)「Repo は Klg 依存性の長期記憶形成に必要である」という仮説について検証するため、レスキュー実験を行った。長期記憶学習直前にグリア細胞で klg を急性ノックダウンすると長期記憶障害が観察される。しかし、同時に野生型 repo の強制発現を行うと、長期記憶障害はレスキューされた。この時、ネガティブコントロールとして、野生型 repo ではなく、DNA に結合できない変異 repo や関係ないタンパク GFP を同時発現させ、これらではレスキューできないことを確認した。

(5) 当初は長期記憶形成時の Repo ターゲット遺伝子について明らかにする予定であっ

たが、Klg-Repo 経路と加齢性記憶障害の関連という興味深い事象を見いだしたため、予定を変更し、こちらの解析を優先的に行った。具体的には、(I) ショウジョウバエは加齢性の長期記憶障害を示すが、加齢個体では Klg および Repo の発現量が減少していた。(II) 加齢個体および Klg 変異体の脳では細胞死はほとんど見られないが、これらの脳では長期記憶学習後に特異的に細胞死が観察されること、を見いだした。

以上の結果より、

(1) 長期記憶学習により、グルタミン酸作動性神経/ドーパミン酸作動性神経とアストロサイトグリア間で Klg を介した相互作用が生じ、その結果長期記憶形成に必要な Repo 依存性のグリアの遺伝子発現が促されること

(2) Klg-Repo 経路によるグリアの遺伝子発現増加は長期記憶学習後の細胞死を抑えること、この細胞死が加齢性長期記憶障害の原因となっている可能性が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1件)

Hirano Y, Masuda T, Naganos S, Matsuno M, Ueno K, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M  
Fasting launches CRTC to facilitate long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 339(6118):443-446.(2013) 査読有

[学会発表](計4件)

松野元美 “長期記憶形成に必要なグリア転写因子 Repo による遺伝子発現”平成 25 年度生理研研究会「記憶回路研究会」岡崎(生理学研究所)平成 25 年 12 月 11 日

Motomi Matsuno, Junjiro Horiuchi, Minoru Saitoe “Neuron-glia communication induces glial protein synthesis required for formation of

long-term memories” 第36回日本分子  
生物学会 神戸ポートアイランド 平成  
25年12月4日

Motomi Matsuno, Junjiro Horiuchi,  
Minoru Saitoe “ Long-term memory  
formation requires neuron-glia  
signaling to induce protein synthesis”  
CSFN2013 Cell symposia-The  
Networked Brain- San Diego (USA)  
平成25年11月7日

Motomi Matsuno, Minoru Saitoe “A  
neuron-glia communication  
underlying long-term memory  
formation” 第35回日本神経科学学会  
シンポジウム-Studying brain function  
in cellular resolution- 名古屋国際会  
議場 平成24年9月19日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松野 元美 (MATSUNO, Motomi)  
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・主席研究員  
研究者番号：90392365