

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650116

研究課題名(和文) 睡眠による記憶固定化メカニズム解明に向けたショウジョウバエによる新規アプローチ

研究課題名(英文) Mechanisms of sleep dependent memory consolidation in Drosophila

研究代表者

坂井 貴臣 (Sakai, Takaomi)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50322730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：時計遺伝子period (per) は概日リズム形成に必須であるが、長期記憶形成にも必須である。本研究では、長期記憶形成に必須なPer発現ニューロンを同定した。ventral lateral neurons (LNvs)と呼ばれる6個のニューロンでPerが発現している。さらに、それらの内3個のニューロンでは神経ペプチドNPFが発現している。我々はPer-positiveかつNPF-negativeなLNdニューロンが長期記憶形成に関与すること、そして、これらのニューロンのPer発現抑制は、概日リズムや睡眠調節には影響を与えないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：A circadian clock gene, period (per), plays an important role in the generation of circadian rhythms and Long-term memory (LTM) formation. In this study, we identified per-expressing neurons relevant to LTM formation. There are about 150 circadian clock neurons in the adult Drosophila brain. Among these neurons, the per-expressing dorsal lateral neurons (LNds) were critically involved in LTM formation. However, inhibition of per expression in LNds did not affect the circadian rhythms or sleep regulation. In contrast to LNd-specific knockdown of per, pan-neural knockdown of per induced arrhythmic locomotor activity, and reduced nighttime sleep. Taken together, LNds seem to be responsible for the LTM formation, although other Per-positive neurons contribute to circadian rhythms and sleep/awake cycles.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：period 時計遺伝子 睡眠 記憶固定化 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

「睡眠による記憶固定化」は学習後の睡眠によって長期間持続する記憶として定着する現象だが、そのメカニズムは不明である。

申請者は、オスの求愛を利用した長期記憶測定法(求愛条件付け)を確立し、時計遺伝子 *period* (*per*) が長期記憶形成に必須であり、そして、*per* 以外の時計遺伝子は長期記憶形成に関与しないことをこれまでに報告した (PNAS 2004, 101:16058-)。 *per* null mutant では長期記憶が消失する。一方、heat-shock promoter を用いて *per* を過剰に発現させると、野生型よりも短い学習時間で長期記憶を獲得することができる(長期記憶の促進)。

ハエ脳内には *per* 発現ニューロンが約 150 個存在するが、長期記憶形成に必須なニューロンは不明であった。我々は、長期記憶形成に必要な *per* 発現ニューロンは脳内の限られたニューロンであることを 2012 年に報告した (*Learning & Memory*, 2012, 19:471-574)。ショウジョウバエの GAL4/UAS 遺伝子発現システムでは、酵母由来の転写因子 GAL4 が発現する細胞に特定の遺伝子を発現させることができる。ハエ成虫脳の扇状体と呼ばれる脳領域の一部で GAL4 が発現する系統 (OK348) と UAS-*per* の F₁ 個体では GAL4 発現細胞で *per* が過剰に発現して長期記憶が促進する。また、OK348 と UAS-*per* RNAi の F₁ 個体では GAL4 発現細胞における *per* の発現が抑制されるが、これらのハエでは長期記憶が消失した。これらの結果は、OK348 の GAL4-positive neurons 中の *per* 発現細胞が長期記憶形成に関与することを意味している。その後の研究により、OK348 では dorsal latera neurons (LNds) および ventral lateral neurons (LNvs) と呼ばれる数個の *per* 発現ニューロンで GAL4 が発現していることを明らかにした。

一方、ハエの扇状体ニューロンは睡眠制御に関与すること、また、ハエは学習後 4 時間以上眠ることで記憶が固定化されて長期記憶が作られることが知られていた (*Science*, 2011, 332: 1571-)。これらの報告と、我々の先行研究の結果を踏まえ、*per* 発現ニューロンにおける *per* の発現が睡眠調節と長期記憶形成の両方に関与し、睡眠による記憶固定化を制御している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、時計遺伝子 *per* が睡眠による

記憶固定化の制御に関与しているのかを明らかにすることを目的とし、以下の 3 つの研究を遂行した。

ハエ脳内には *per* 発現ニューロンが約 150 個存在する。それらのニューロンの中で、長期記憶形成に必須なニューロンを詳細に同定する。

per がハエの睡眠調節に関与するのかを明らかにする。

長期記憶形成に必須な *per* 発現ニューロンは睡眠の調節に関与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

PER 抗体を用いた免疫染色により、脳の一部のニューロンに GAL4 が発現している 33 系統の中から、LNds で GAL4 が発現している系統を選別した。さらにそれらの中から LNvs で GAL4 が発現していない系統を選別した。

同定した GAL4 系統と UAS-*per* RNAi の F₁ 個体を用い、LNvs もしくは LNds の *per* 発現抑制により長期記憶形成が抑制される GAL4 系統を選別した。

多くの時計ニューロンで GAL4 が発現している tim-GAL4 系統と UAS-*per* RNAi の F₁ 個体を用い、睡眠を測定した。ハエは明暗サイクル条件下で飼育し、睡眠測定も同じ光条件で行った。また、恒暗条件下での概日リズムも測定した。

で同定した GAL4 系統と UAS-*per* RNAi の F₁ 個体を用い、睡眠を測定した。また、恒暗条件下での概日リズムも測定した。

4. 研究成果

長期記憶形成に必須な *per* 発現ニューロンの同定

脳の一部のニューロンに GAL4 が発現している 33 系統の中から、LNds の一部で GAL4 が発現している 17 系統を選別した。それらの系統の 1 つである *drl*[PGAL8] と UAS-*per* RNAi の F₁ 個体を用いて *per* 発現抑制実験を行った。その結果、OK348 を用いた時と同様に長期記憶は確認されなかった。しかし、

drl[PGAL8]はLNdsのみならず, LNvsの一部でもGLA4が発現していた。

次に, LNdsでGAL4が発現している17系統の中から, LNvsでGAL4が発現していない系統を選別し結果, 1系統見出すことができた。この系統をJanelia GAL4-1と名付けた。Janelia GAL4-1とUAS-*per* RNAiのF₁個体を用いて*per*発現抑制実験を行った。その結果, 長期記憶は確認されなかった。

神経ペプチドであるPDFはLNvsに特異的に発現している。そこで, Pdf-GAL4とUAS-*per* RNAiのF₁個体を用いて*per*発現抑制実験を行ったところ, 長期記憶が確認された。以上の結果から, PER依存的な長期記憶には, 主にLNdsが関与することが明らかになった。

神経ペプチドであるNPFはLNdsの一部のニューロンで発現していることが知られている。LNdsは約6個のニューロンで構成されているが, そのうちの3個のニューロンでNPFが発現している。そこで, LNdsの中でもNPF-positiveなニューロンがPER依存的な長期記憶に関与するかどうかを明らかにする実験を行った。nfp-GAL4-1とUAS-*per* RNAiのF₁個体を用いて*per*発現抑制実験を行ったところ, 長期記憶が確認された。

さらに, Janelia GAL4-1系統のGAL4-positiveなLNdニューロンでNPFが発現しているかどうか検証した。NPF抗体による免疫染色の結果, GAL4-positiveなLNdニューロンではNPFが発現していないことが明らかとなった。同様に, OK348系統に関しても調べたところ, GAL4-positiveなLNdニューロンではNPFが発現していなかった。以上の結果から, LNdsの中でもNPFを発現しない3個のPER-positiveなニューロンのいずれかが長期記憶形成に必要であることが明らかになった。

perの発現は睡眠調節に関与するか?

コントロールでは恒暗条件下で約24時間の行動リズムが確認できたが, *per*発現抑制系統では, 約40%のハエで概日リズムが消失した。また, 残りの60%は長周期になっていた。これらの結果は, *per*-RNAiが*per*の発現を抑制していることを意味している。

明暗サイクル条件下で睡眠を測定したところ, *per*発現抑制系統ではコントロールと比べて夜の睡眠量が減少していることが明らかになった。一方, 昼の睡眠には影響は見られなかった。これらの結果は, 時計ニュー

ロンにおける*per*の発現は夜の睡眠を維持するために必要であることを示唆している。

長期記憶に必要なLNdsにおけるperの発現は睡眠調節に必要か?

Janelia GAL4-1とUAS-*per* RNAiのF₁個体を用いて概日リズムと睡眠を測定した。これらのハエでは, 長期記憶に必要なLNdsにおける*per*の発現が抑制されると考えられる。これらのF₁個体では, 恒暗条件下の概日歩行リズム, および睡眠量に特段の異常は認められなかった。

以上の研究結果から, 以下に示す3点が明らかになった。

- (1) 脳で発現する約150個の*per*発現ニューロンの内, 主にLNdsが長期記憶形成に関与している。また, LNdsの6個のニューロンの内, 長期記憶形成に関与するのはNPF-negativeな3個のニューロンである。
- (2) 概日時計ニューロンにおける*per*遺伝子の発現は明暗サイクル条件下で夜の睡眠を維持するために必要であるが, LNdsは*per*依存的な睡眠制御に関与していない。
- (3) 長期記憶形成に必須なLNdsは概日歩行リズムの調節には関与しない。

本研究ではLNvs特異的な*per*発現抑制は長期記憶に影響を与えなかった。しかし, LNvsの神経活動を抑制したハエでは長期記憶がつかれないことを我々は確認している。本研究ではpdf-GAL4とUAS-*per* RNAiのF₁個体を用いたが, *per*の発現量がどの程度抑制されているのかは不明である。RNA干渉法では遺伝子発現量を完全に抑制することは困難であるため, 今回の結果からLNvsの*per*発現が長期記憶形成には関与しない, と結論することはできない。今後はLNvs特異的な*per*ノックアウト系統などを利用して解析を行う必要がある。

*per*遺伝子は, 概日リズム, 睡眠調節, 長期記憶形成に必須であるが, LNdsは主に長期記憶形成に影響を与えられられる。本研究課題では, 睡眠調節にかかわる*per*発現ニューロンの同定にはまだいたっていないが, *per*発現ニューロン間の神経ネットワークを利用して学習後の睡眠調節や, 睡眠中の記憶固定化に影響を与えている可能性も考えられる。今後は, *per*発現ニューロン間の

情報伝達経路が存在するか，また学習を介してそれらの情報伝達に変化が生じるか，などより詳細な検証を行う必要がある。

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 7 件)

Mabuchi I, Shimada N, Sato S, Ienaga K, Inami S, and *Sakai T (2016) Mushroom body signaling is required for locomotor activity rhythms in *Drosophila*. *Neurosci. Res.* (in press) 査読有

Naganos S, Ueno K, Horiuchi J, Saitoe M. (2016) Learning defects in *Drosophila* growth restricted chico mutants are caused by attenuated adenylyl cyclase activity. *Mol Brain*. 9(1):37. 査読有

Watanabe, K. and *Sakai, T. (2015) Knockout mutations of insulin-like peptides enhance sexual receptivity in *Drosophila* virgin females. *Genes and Genetic System* 90: 237-241. 査読有

Ohashi, H. and *Sakai, T. (2015) Novel behavioral assay of wasabi avoidance in *Drosophila* using a video tracking system. *Appl. Entmol. Zool.* 50: 137-142. 査読有

Sato S., Kitamoto T., and *Sakai T. (2014) Modulation of innate and learned sexual behaviors by the TRP channel Painless expressed in the fruit fly brain: behavioral genetic analysis and its implication. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: Article 400 査読有

*Sakai, T., Watanabe, K., Ohashi, H., Sato, S., Inami, S., Shimada, N., Kitamoto, T. (2014) Insulin-producing cells regulate the sexual receptivity through the Painless TRP channel in *Drosophila* virgin females. *PLoS ONE* 9(2): e88175. 査読有

Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y, Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Honda Y, Kodama T, Masuda T, Saitoe M. (2014) Glial dysfunction causes age-related memory impairment in *Drosophila*. *Neuron*. 84(4):753-63. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

Sato S., Ueno K. and Sakai T. (2015)

Postsynaptic cAMP production is required for activity-dependent reduction of Ca²⁺ responses in *Drosophila* mushroom body. Neuroscience 2015 (第 38 回日本神経科学大会)7 月 28-31. 兵庫県神戸市

Inami S., Shimada N., Asano T., Kitamoto T., Sakai T. (2015) *Drosophila* LIM homeodomain transcription factor Apterous is expressed in adult mushroom body and PDF neurons to play differential roles in processing long-term courtship memory. Cold Spring Harbor meeting Neurobiology of *Drosophila*. NY, 2015/9/29-10/3

Inami S., Shimada N., Asano T., Kitamoto T., Sakai T. (2015) The apterous expression in mushroom body and PDF neurons regulates long-term memory in *Drosophila*. Neuroscience 2015 (第 38 回日本神経科学大会) 7/28-31. 兵庫県神戸市

Ohashi H, Watanabe K, and Sakai T. (2015) Characterization of a putative promoter region of the *Drosophila* Painless to drive sensory neuron-specific gene expression. Neuroscience2015(第 38 回日本神経科学大会) 7 月 28-31. 兵庫県神戸市

Ohashi H and Sakai T. (2015) Molecular mechanisms of starvation-dependent reduction of heat nociception in *Drosophila*. Comp boil 2015 (第 37 回日本比較生理生化学会・第 40 回日本比較内分泌学会 合同大会)12 月 11-13. 広島県広島市

Sato S., Ueno K., and Sakai T. "cAMP signaling is involved in activity-dependent reduction of calcium responses in *Drosophila* mushroom body" Neuroscience2014 (Annual meeting of Society for Neuroscience), Washington DC, 2014/11/15-19

Sato S., Ueno K., and Sakai T. "Activity-dependent reduction of Ca²⁺ responses through AL-MB synaptic transmission in the isolated *Drosophila* brain" Neuroscience2014 (第 37 回日本神経科学大会) 神奈川県横浜市 2014/9/11-13

Inami S., Asano T., and Sakai T. "Mapping brain neurons involved in apterous-dependent long-term memory in *Drosophila*" Neuroscience2014 (第 37 回日本神経科学大会) 神奈川県横浜市 2014/9/11-13

Ohashi H. and Sakai T. "Appropriate starvation reduces noxious heat responses in *Drosophila* adults" Neuroscience2014 (第 37 回日本神経科学大

会) 神奈川県横浜市 2014/9/11-13

Shimada N. Inami S., and Sakai T.
"Expression of the Drosophila LIM-Homeobox gene, apterous, in PDF-producing neurons is required for Drosophila sleep."
Neuroscience2014 (第37回日本神経科学大会) 神奈川県横浜市 2014/9/11-13

Watanabe K. and Sakai T. "Insulin-like peptides are involved in the regulation of sexual receptivity in Drosophila virgin females"
Neuroscience2014 (第37回日本神経科学大会) 神奈川県横浜市 2014/9/11-13

Ohashi H. and Sakai T. "Novel behavioral assay of noxious heat responses in Drosophila using decapitated flies "
11th international congress of Neuroethology (ICN2014), Hokkaido Sapporo, 2014/7/28-8/2

Watanabe K. and Sakai T. "The painless gene is involved in female mate choice in Drosophila"
11th international congress of Neuroethology (ICN2014), Hokkaido Sapporo, 2014/7/28-8/2

Inami, S., Asaano, T., and Sakai, T.
"Neuropeptide-expressing neurons contribute to apterous-dependent long-term courtship memory in Drosophila "
JSCP2013(日本比較生理生化学会第35回大会) 兵庫県姫路市 2013/7/13-15

Shimada, N., Sakai, T. "Expression of the LIM homeobox gene, apterous, in the brain neurons is required for normal arousal-sleep "
JSCP2013(日本比較生理生化学会第35回大会) 兵庫県姫路市 2013/7/13-15

Watanabe, K., Sakai, T. "Insulin-like peptides play a role in the regulation of sexual receptivity in Drosophila virgin females "
JSCP2013(日本比較生理生化学会第35回大会) 兵庫県姫路市 2013/7/13-15

Inami, S., Asaano, T., and Sakai, T.
"Mapping brain neurons involved in apterous-dependent regulation of long-term courtship memory in Drosophila "
Neuro2013 京都府京都市 2013/6/20-23

Shimada, N., Sakai, T. "The Drosophila LIM homeobox gene, apterous, is involved in the regulation of sleep/arousal "
Neuro2013 京都府京都市 2013/6/20-23

Watanabe, K., Sakai, T. "Expression of Pain TRP channels and Insulin-like peptides in the insulin producing neurons is involved in the regulation of sexual receptivity in Drosophila

virgin females " Neuro2013 京都府京都市 2013/6/20-23

〔図書〕(計 1 件)

研究者が教える動物実験第3巻 行動 第3章 - 28 虫の織り成す恋愛模様(キロシウジョウバエ), 2015年7月, 共立出版

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tmu.ac.jp/stafflist/data/sa/489.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
坂井貴臣 (SAKAI, Takaomi)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号: 23370035
- (2) 研究分担者
上野耕平 (UENO, Kohei)
東京都医学総合研究所・研究員
研究者番号: 40332556
- (3) 連携研究者
藤井宣晴 (HUJII, Nobuharu)
首都大学東京・人間健康科学研究科・教授
研究者番号: 40509296