

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840124

研究課題名(和文) 記憶を規定する神経回路動態のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic mechanism that regulates a neural circuit for *C. elegans* behavioral plasticity

研究代表者

杉 拓磨 (Sugi, Takuma)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教(特任)

研究者番号：70571305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、記憶とエピジェネティクスとの関係を調べるため、物理刺激に対する、線虫 *C. elegans* の馴化学習・記憶現象をモデル系とした研究を行った。まず、(1) *C. elegans* の記憶をハイスループットに定量化するための装置を開発した。(2) その装置を用い、記憶を担う神経細胞を同定し、*C. elegans* の記憶を制御する遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated a mechanistic relationship between epigenetics and behavioral memory in *C. elegans*. I initially developed a multiplexed optical system to genetically analyze *C. elegans* mechanosensory habituation in a high-throughput manner. Then, using this system, I identified two interneurons involved in memory formation, and an epigenetic factor important for memory formation.

研究分野：生物物理学

キーワード：記憶 エピジェネティクス 線虫 *C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

環境からの刺激による後天的なヒストンや DNA へのメチル基などの共有結合を介した遺伝子発現調節をエピジェネティクスと総称する。エピジェネティクスは一般に細胞分化などの長期的、恒常的な細胞の機能調節を担う。

記憶は個々のニューロンの長期的、恒常的な機能調節とそのネットワーク化により成立する。記憶の成立は古くから転写因子 CREB などによる遺伝子発現調節を受けることが知られていることから、近年、国内外の研究により、記憶はクロマチン構造変化を介したエピジェネティックな制御を受ける可能性が唱えられている。例えばヒストン修飾酵素 CBP/p300 のヘテロジェニックマウスでは、重篤な精神遅滞が引き起こされる観察や (Alarcon et al. 2004) 一度形成された記憶の維持はクロマチンや DNA の修飾に依存することが示されている (Korzus et al. 2004)。

我々は最近、線虫 *C. elegans* の温度刺激や振動刺激の記憶が CREB やエストロゲン受容体様タンパク質による核内制御を受けることを発表した (Sugi et al. 2011; Nishida, Sugi et al. 2011; Timbers & Rankin, 2011)。CREB やエストロゲン受容体は CBP/p300 などのエピジェネティクス制御因子と密接に関連することが知られており、*C. elegans* の記憶もエピジェネティックな制御を受ける可能性が予想される。本研究では記憶により規定される振動応答行動の計測システムを構築し、記憶とエピジェネティクスを関連づける分子基盤を同定することを目指した。

2. 研究の目的

C. elegans は振動刺激を感じると、通常、忌避的に後ろ向きの移動を行うが、定期的な振動刺激によるトレーニングを行うと、振動に慣れ、記憶するので、24 時間後に再び振動を与えても、後方への移動距離の顕著な減少・消失が見られる。本研究では、

分子遺伝学的操作を施したトランスジェニック株をはじめとする *C. elegans* 株の振動応答行動をハイスループットに計測できるかどうか課題解決にとって重要になると考えられた。しかし、*C. elegans* では導入した目的遺伝子が染色体外で保持され、ゲノムに組み込まれないので、1 個体のトランスジェニック株から産卵される全個体の中で導入遺伝子を保持する個体の割合は数 10% 程度である。つまり、非トランスジェニックの個体が混在する中からトランスジェニック株の行動のみを選択的に検出する必要がある。しかし、従来の装置 (Swierczek et al. *Nature Methods*, 2011) では、計測に多大な時間が必要とされ、複数種類の株の行動を同時に比較計測するのも困難であった。そこで、光学システムと振動発生装置を組み合わせ、新たな行動計測装置を開発することを第 1 目的とした。次に、開発した装置を用い、記憶形成に関わる神経細胞を同定し、エピジェネティックな因子を明らかにすることを第 2 目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子導入によりトランスジェニック株を作製した場合、1 個体のトランスジェニック *C. elegans* から産生される個体群には、導入遺伝子を持たない非トランスジェニックの線虫が含まれる。そこで、複数の飼育プレートと並列に設置し、各プレート上でトランスジェニック *C. elegans* の行動のみを検知する光学システムを作製した。まず遺伝子導入の際に、目的遺伝子と GFP 遺伝子を共発現させ、それら 2 つの遺伝子の染色体外アレイをもつトランスジェニック *C. elegans* を GFP 蛍光で検知できるようにした。空間的に分岐させた 488 nm の励起レーザー光を、最大 4 種類のトランスジェニック株の飼育プレートのそれぞれに同時に誘導照射し、吸収フィルター付きの USB 式 CCD カメラで各プレートの 30~40 個体の線虫の行動を一度に記録するように工夫した。この光学系に、振動発生機

器を組み込み、最大9種類の飼育プレートと同時に任意の時間間隔で振動刺激を与えることを可能にした。また、Mathematica8.0でスクリプトを作製し、各線虫が後方へ移動した距離を自動的に抽出・数値化できるようにした。

4. 研究成果

第1目的である、開発した装置の評価を行った。まず、野生株にGFPマーカーのみを発現させた株を飼育したプレートを並列に設置し、同装置を用い、振動刺激によりトレーニングを施し、18時間放置した。次に、記憶が実際に形成されているかをテストした結果、トレーニングを施していない*C. elegans*群と比較し、トレーニングを施した*C. elegans*群では、有意に振動刺激に対する後ずさり距離が減少した。このことから、本装置により*C. elegans*群が振動刺激に馴化し、その状態を記憶していることが明らかになった。つまり、開発した装置が目的に沿うものであることが示された。次に、転写因子CREBのドミナントネガティブフォームを作製し、これを細胞特異的に発現させることにより、各神経細胞のCREBを阻害し、それらの株の記憶を定量化した。その結果、介在神経細胞AVAとAVDを同時に阻害した場合に、馴化学習・記憶に異常を示したことから、これらの2つの神経細胞に記憶が保持されていることが明らかになった。次に、第2目的である、分子メカニズムを解析した。その結果、同定された2つの介在神経細胞に特異的に高発現する膜タンパク質の発現解析から、新規遺伝子を発見した。この新規遺伝子の哺乳類のオルソログはATACヒストンアセチルトランスフェラーゼと相互作用することが既知であるため、現在、この複合体の記憶形成における役割を解析している。

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 3 件)

1) Takuma Sugi*, Yasuko Ohtani, Yuta Kumiya, Ryuji Igarashi, Masahiro Shirakawa
High-throughput optical quantification of mechanosensory habituation reveals neurons encoding memory in *Caenorhabditis elegans*
Proc Natl Acad Sci USA Vol. 111 No.48, 17236-17241, 2014 査読有

2) Takuma Sugi*, Yasuko Ohtani
Simplified method for cell-specific gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans*
Biochem Biophys Res Commun Vol. 450 No.1, 330-334, 2014 査読有

3) Takuma Sugi#,*, Tetsushi Sakuma#, Yasuko Ohtani, Takashi Yamamoto (#: 共同筆頭著者)
Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*
Dev Growth Differ Vol. 56 No.1, 78-85, 2014 査読有

[学会発表](計 5 件)

1) Takuma Sugi
Transcription activator like effector nuclease-mediated knockout mutants in *C. elegans* to study neural circuits
International Single Molecule & Genome Engineering/Editing Europe, University of Cambridge, UK, 2014

2) 杉 拓磨
「線虫の記憶を刻むリズムとエピジェネティクス」
理化学研究所、和光、2014年

3) 杉 拓磨
「線虫*C. elegans*のゲノム編集による個体機能の再構成への試み」
第3回ゲノム編集研究会、広島大学、2013年

4) Takuma Sugi
“High-throughput behavioral imaging reveals the neurons responsible for mechanosensory memory in *C. elegans*”,
19th international *C. elegans* meeting, Los Angeles, 2013

研究者番号：70571305

5) Takuma Sugi

“Biophysical analysis of *C. elegans* mechanosensory learning and memory”, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都国際会館, 2013

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

〔図書〕(計 2 件)

1) Takuma Sugi (分担執筆)

Book Title: Targeted Genome Editing Using Site-specific Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System Chapter 4: Genome editing in nematode *Springer*, 2015

2) 杉 拓磨 (分担執筆)

今すぐ始めるゲノム編集 (TALEN を用いた線虫の遺伝子改変法)
実験医学別冊 122-129, 2014

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://takumasugi.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉 拓磨 (SUGI TAKUMA)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特任助教