

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870172

研究課題名(和文) 記憶学習において働くインスリンシグナル伝達の時空間的動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of temporal and spatial dynamics of the insulin signaling pathway during learning and memory

研究代表者

富岡 征大 (Tomioka, Masahiro)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40466800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、線虫の示す飢餓と化学物質とを結びつけて記憶する学習(飢餓学習)には外界の化学物質を受容する感覚神経におけるインスリンシグナル伝達経路の働きが重要であることが示唆されていた。本研究により、線虫の感覚神経内の異なる部位(細胞体と軸索)では異なるインスリン経路が協調的に働き、それらの間のクロストークが記憶の形成に必要なことが明らかになった。学習記憶の異なる過程において働くインスリン様ペプチドの同定、シナプス部位において記憶の呼び出しに関わる可能性があるユビキチンシステムの同定により、学習記憶をダイナミックに制御するインスリン経路の制御機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the insulin signaling pathway acting in chemosensory neurons is important for starvation learning, in which *C. elegans* worms learn to avoid chemicals after prolonged exposure to the chemicals under starvation conditions. In this study, we showed that different kinds of insulin pathway act in distinct parts of the chemosensory neurons (the cell body and axon) and crosstalk between them are required for starvation learning. We further identified candidates of insulin-like peptides that act in each process of starvation learning (memory acquisition, retention and retrieval) and the ubiquitin system which may regulate memory retrieval in the axon. Our study revealed some mechanisms in which the insulin pathways dynamically regulate neuronal functions during learning and memory.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：インスリン 学習 記憶 *C. elegans* 選択的スプライシング 化学感覚 飢餓応答 行動

## 1. 研究開始当初の背景

インスリンやインスリン様成長因子 (IGF) を含むインスリン様ペプチドは、末梢組織における働きに加え、脳内においても重要な働きを担う。例えば、インスリンや IGF2 をネズミの脳内に投与すると、記憶力が向上する。インスリンや IGF1 は神経細胞に作用し、神経伝達物質の放出や受容体の機能調節により神経可塑性を制御する。従って、インスリン様ペプチドは、エネルギー代謝を介した間接的な働きに加えて、直接的にシナプス伝達を制御することで記憶・学習の調節を行っている可能性が示唆されている。

線虫 *C. elegans* は、餌情報と環境情報とを組み合わせた様々な記憶を形成し、生存に有利な場所へと移動する。我々は線虫の神経系において働くインスリン様シグナル伝達経路が記憶学習の制御に必須の役割を持つことを明らかにしている。線虫ゲノムには 40 種類のインスリン様遺伝子がコードされており、その多くは神経系で発現する。そのうちの一つである *ins-1* の変異体は環境中に含まれる化学物質と飢餓とを関連付けて記憶する能力 (飢餓学習) に著しい欠損を示す。シナプスに存在する INS-1 は、味覚神経の DAF-2 (インスリン/IGF1 受容体ホモログ) に作用し、PI3 キナーゼ/Akt シグナル伝達を介して学習行動を制御する。

近年我々は、DAF-2 のスプライシングアイソフォーム「DAF-2c」の学習における制御機構を明らかにしている。DAF-2c は、絶食に応じて味覚神経軸索のシナプス領域へと運ばれ、飢餓学習を制御する。一方、主に細胞体に局在する「DAF-2a」は絶食に応じて DAF-16 (FOXO 型転写因子) の核内移行を促進する。研究開始当初、インスリン経路は未知の分子機構を介してシナプス領域で働くものと DAF-16 を介して細胞体で働くものの両方が飢餓学習に必要である可能性が示唆されていたが、その詳しい制御機構は未知であった。

## 2. 研究の目的

記憶の獲得・保持・想起において化学感覚神経で働くインスリンシグナル伝達経路の詳しい制御機構を明らかにすることを目的とした。具体的な目標として下記の ~ を設定した。

40 種存在するインスリン様ペプチドの中から線虫の飢餓学習を制御する新たなペプチドを探し出し、学習記憶の各過程において異なるインスリン様ペプチドが働く可能性を検証する。

記憶の獲得における DAF-16 転写因子の役割を明らかにする。

記憶の想起の際にシナプス領域で働くインスリン経路の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

絶食に応じたインスリン様ペプチドの発現変動をリアルタイム PCR 法や蛍光たんぱく質レポーターを用いて観測する。インスリン様分子の変異体や強制発現株を用いて、線虫の飢餓学習を制御する新たなインスリン様ペプチドを探し出す。さらに、飢餓学習において、条件付け時や条件付け後の学習行動時においてインスリン様ペプチドを強制的に分泌させたときの学習への影響を見ることでインスリン様ペプチドが働く学習記憶の過程を明らかにする。

DAF-16 の変異体や DAF-16 を強制的に核内に移行させた形質転換体を用いて、DAF-16 依存の転写活性を変化させた時の学習行動への影響を観察する。さらに、飢餓条件付け中における DAF-16 活性とインスリン受容体の軸索輸送との相互作用を遺伝学的解析により明らかにする。

インスリン経路の変異体を用いた遺伝学的スクリーニングで得られた変異体の原因遺伝子の同定及び機能解析により、学習行動においてインスリン経路が制御する分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

**-1 飢餓学習において餌情報を伝える新たなインスリン様分子の同定**：研究開始後間もなくして発表された文献 (Genome Res. 2013 23: 954-965) を参考に、餌の有無に依存して遺伝子発現が変化する 9 つの遺伝子に注目し、その変異体及び強制発現株の飢餓学習を調べた。その結果、絶食により発現低下することが報告されている 2 種のインスリン遺伝子の変異体及び強制発現株で飢餓学習に異常が見られ、これらのインスリン様分子が学習行動に関わることがわかった。次に、これらのインスリン遺伝子の絶食による発現変動を確かめた。その結果は過去の報告を概ね再現したが、インスリン遺伝子の絶食に応じた発現変動はそれまで飼育されていた餌 (大腸菌) の種類により変わることが分かった。さらに、インスリン遺伝子は飢餓学習に関わる幾つかの感覚神経及び非神経組織で発現することがわかり、その発現変動は神経系と末梢組織では異なる傾向がみられた。以上の結果より、飢餓学習に関わるインスリン遺伝子は様々な環境要因に依存して組織依存的に発現変動することが明らかになった。

**-2 インスリン様ペプチド INS-1 の強制分泌は記憶の読み出しを促進し記憶の形成を阻害する**：*ins-1* 変異体に哺乳類カプサイシン受容体 (VR1) とともに INS-1 を異所発現させ、飢餓条件付け時若しくは条件付け後の学習行動時のみにカプサイシンを与えることで INS-1 を時期特異的に分泌させた。その結果、学習行動時のみの INS-1 の分泌により *ins-1* 変異体の飢餓学習異常が完全に回復した。一

方、面白いことに INS-1 を条件付け時のみに分泌させると、逆に学習異常が増強された。以上の結果は、INS-1 が条件付け後の記憶の読み出し時に働くことを強く示唆している。さらに、学習時の INS-1 の過剰分泌はおそらく他のインスリン様ペプチドの働きを阻害することで学習異常を生じさせることを示唆している。今後、-2 で同定した飢餓学習に関わるインスリン様ペプチドが学習時に飢餓の情報を伝える可能性を検証していきたい。

**記憶の獲得時に DAF-16 は DAF-2c のシナプス領域の輸送を制御するかもしれない**：味覚神経の細胞体で働く DAF-16 とシナプスで働く DAF-2c との相互作用を遺伝学的に解析した。まず、DAF-2c の産生に関わるスプライシング分子と *daf-16* との多重変異体の飢餓学習を調べたところ、多重変異体はそれぞれの遺伝子の単独変異体と比べて学習欠損が増強され、飢餓条件付け後もまるで飢餓を経験していないかのような強い学習異常を示した。この結果から、細胞内の異なる場所で協調的に働くインスリン経路は飢餓学習に不可欠であることが強く示唆された。次に、*daf-16* 変異体の味覚神経に DAF-2c を過剰発現させたところ *daf-16* 変異体の学習異常が抑圧された。この結果は、DAF-16 を介した転写調節は DAF-2c の産生や軸索への移行を制御していることを示唆している。そこで、*daf-16* 変異体において DAF-2c の産生能、すなわち DAF-2c 産生に必要なカセットエキソン (exon 11.5) の包含の程度を調べたところ、野生株と比べて変わらなかった。以上の結果から、DAF-16 は転写制御を介して DAF-2c の軸索輸送を促進することで飢餓学習を調節している可能性が示唆された。本研究において、CRISPR/Cas9 システムを用いて *daf-2* exon 11.5 内に欠失を導入した変異体、すなわち DAF-2c アイソフォーム特異的変異体を作成し、この変異体は著しい飢餓学習を示すことを確認した。今後は、この変異体を用いて DAF-16 と DAF-2c の飢餓学習におけるクロストークについて更に詳細に解析を進める。

**線虫の学習記憶には E3 ユビキチンリガーゼの働きが必要である**：これまでの研究により、飢餓学習に異常を示す Akt 変異体の抑圧変異体を獲得している。この変異体は、DAF-2 の下流分子の DAF-16 と Akt との二重変異体とは異なる表現型を示すため、DAF-2 の新規下流分子、特にシナプスにおいて DAF-2c 経路の下流で機能する分子の変異体であることが期待される。今回、全ゲノムシーケンス解析及びゲノム断片を用いた機能回復実験により、この変異体の原因遺伝子は E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子であることが分かった。さらに、この遺伝子のパラログ遺伝子の変異体の飢餓学習を調べたところ、

複数の E3 ユビキチンリガーゼの変異体で学習異常が観察された。以上の結果は、ユビキチンシステムは線虫の飢餓学習の制御に重要であることを示唆している。今後は、ユビキチンシステムが働く細胞、細胞内部位、及びそのターゲット分子を明らかにすることにより学習制御に関わるユビキチンシステムの制御機構を確立したい。

## 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)

\*Tomioka M, Naito Y, Kuroyanagi H, \*lino Y (\*Corresponding authors) Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor Nat Commun 7:11645 (2016) doi: 10.1038/ncomms11645 (査読有)

Ohno H, Kato S, Naito Y, Kunitomo H, \*Tomioka M, \*lino Y (\*Corresponding authors) Role of synaptic phosphatidylinositol 3-kinase in a behavioral learning response in *C. elegans* Science 345:313-7 (2014) doi: 10.1126/science.1250709 (査読有)

Sakai N, Iwata R, Yokoi S, Butcher RA, Clardy J, Tomioka M, lino Y A sexually conditioned switch of chemosensory behavior in *C. elegans* PLoS One 8:e68676 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0068676 (査読有)

[学会発表](計3件)

富岡征大、内藤泰樹、黒柳秀人、飯野雄二 線虫の記憶学習に関わるニューロタイプ特異的な選択的スプライシングの制御機構 第38回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会 口頭発表 @神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) (2015/12/1)

Tomioka M Regulation of starvation-induced taste learning by insulin-like signaling in *C. elegans* JSPS Core-to-Core Project International Seminar シンポジウム講演 @東京大学(東京都文京区) (2014/10/11)

Tomioka M, Naito Y, Kuroyanagi H, lino Y Combinatorial expression of evolutionally conserved RNA binding proteins determines neuron-type specific alternative splicing of the *daf-2* insulin/IGF receptor in *C. elegans* C. elegans Topic Meeting: Development, Cell Biology & Gene Expression 口頭発表 @奈良県新公会堂(奈良県奈良市) (2014/7/17)

[図書](計3件)

富岡征大, 大野速雄, 飯野雄一 線虫の記憶学習を制御するインスリン受容体のアイソフォーム特異的な働き 細胞工学 Vol. 34 No. 9: 894-899 (2015)

富岡征大, 飯野雄一 シナプスにおけるインスリン/PI3K 経路と記憶学習 門脇 孝編: 糖尿病学 2015 (診断と治療社) 45-52 頁 (2015)

大野速雄, 富岡征大, 飯野雄一 カルシニテンニンに依存したシナプス領域のインスリン/PI3K 経路の活性化が線虫の学習を制御する 実験医学 Vol. 32 No. 19: 3094-3097 (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 :  
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

富岡 征大 (TOMIOKA, Masahiro)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号 : 40466800

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

飯野 雄一 (IINO, Yuichi)  
東京大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号 : 40192471