

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570229

研究課題名(和文) ショウジョウバエ学習・記憶中枢における神経回路微細分岐機構の分子遺伝学的解析

研究課題名(英文) Molecular genetic analyses of the mechanisms of neural circuit fine branching in the learning and memory centers of *Drosophila*

研究代表者

古久保 克男(徳永克男)(FURUKUBO-TOKUNAGA, Katsuo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00272154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳の機能的神経回路の成熟と最適化には、軸索末端での神経分岐、過剰突起刈り込み、シナプス形成制御等を含む様々な過程が存在する。本研究では、ショウジョウバエをモデルに、脳に於ける機能的な神経回路構築の成熟と最適化を制御する機構に焦点を当て、標的領域における軸索末端の微細分岐とシナプス形成を制御する遺伝子機構の解析を行った。これにより精神疾患関連遺伝子を含む多数の遺伝子を同定した。さらに、軸索末端の微細分岐とシナプス形成制御機構の解析により明らかにした分子機構を脳高次機能と結びつけて解析するために、ショウジョウバエ幼虫を使用した人工的記憶誘導系の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The maturation and adaptation of the neural circuits in the brain is achieved via multiple steps involving axonal terminal branching, pruning of excess dendrites, and control of synaptogenesis. In this study, we utilized fruit flies (*Drosophila melanogaster*) to elucidate the molecular mechanisms that control the functional maturation and maximum tuning of neurocircuits in the brain, and analyzed fine branching patterns at the axonal termini and synapse formation. By the use of genetic screening, we have identified several key molecules that control these processes. Moreover, to extend this study to higher order brain functions, we have developed a novel technique that enables artificial induction of olfactory memory in living larvae. Our study has disclosed intriguing molecular genetic mechanisms of functional tuning of the neural circuits, and identified genes that are conserved in humans as risk factors for diverse mental disorders.

研究分野：神経生物学

キーワード：ショウジョウバエ 脳 学習・記憶 神経回路 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

脳の各領域を構成する高次構造の形成は、細胞生成、軸索誘導、突起形成等の多段階からなる過程である。これらの形成過程の大枠を制御する遺伝子機構についてはこれまでに様々なモデル動物を使用した解析が行われ、多数の遺伝子が同定されてきた。しかしながら、脳の機能的神経回路の成熟と最適化には、軸索末端での神経分岐、過剰突起刈り込み、シナプス形成、さらに伝達効率の制御等を含む様々な過程が存在する。軸索分岐様式等の回路最適化を制御するこれらの過程の解析は、高次神経回路形成機構の理解にとって重要な意義を持つのみならず、とりわけ明確な解剖学的変化を伴わない様々なヒト神経機能疾患の、神経回路レベルでの背景として近年内外の研究の焦点となりつつある。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、ショウジョウバエをモデルとした脳形成の分子遺伝学的解析を行い、脳の領域化と高次構造の構築を左右する多数の遺伝子を同定してきた。本研究では、脳に於ける機能的な神経回路構築の成熟と最適化を制御する機構に焦点を当て、標的領域における軸索末端の微細分岐とシナプス形成を制御する遺伝子機構の解析を行う。さらに、光遺伝学等の最新の神経活動操作技術を用いて、神経活動が神経回路分岐パターン及び影響を解析し、遺伝的プログラムとの相互作用を明らかにする。これらの解析により、高次神経回路の成熟と機能的最適化を制御する分子機構の解析を推進する。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ遺伝学を使用して、脳に於ける機能的な神経回路の成熟と最適化を制御する機構に焦点を当て、標的領域における軸索の微細分岐を制御する遺伝子機構の解析を行う。さらに、*in vivo* において神経

活動を人為的に操作することにより、回路微細分岐における遺伝子プログラムと神経活動の相互作用を明らかにし、学習・記憶中枢のような高次神経回路の微細分岐と最適化を制御する分子機構の解析を推進する。分岐異常の検討に際しては、神経回路を神経特異的抗体とシナプス特的抗体とで染色し、神経軸索末端の分岐様式を共焦点顕微鏡によりデジタル画像化する。取得した一連のデータを画像解析プログラムにて処理し、1) 神経分岐点の数、2) 側鎖長、3) シナプスボタン数、4) シナプス総面積を集計する。この定量的解析により、神経軸索末端の微細分岐とシナプス形成を抑制または促進する遺伝子群を明らかにする。

4. 研究成果

軸索末端の微細分岐とシナプス形成制御機構の解析

ショウジョウバエをモデルに、標的領域における軸索の微細分岐を制御する遺伝子機構の解析を行うにあたり、異なる遺伝的背景が微細構造形成に与える影響を排除するために、使用するすべてのショウジョウバエ系統を野生型の標準系統と5回以上戻し交配し、均一な遺伝的ストックをまず確立した。さらに、神経軸索末端の微細分岐構造が変化する多様な遺伝子を探索するために、既知の制御遺伝子の過剰発現により軸索微細分岐を遺伝的に鋭敏化した系統を作成した。これらの系統を使用して、米国および京都のショウジョウバエストックセンターから入手した様々な遺伝子に対する変異体について、キノコ体神経末端の分子様式を解析し、軸索末端の分岐点の数と側鎖長が野生型と比べて増加する変異系統、及び減少する変異系統を多数同定した。さらに、これらの変異体についてキノコ体のみならず、神経筋接合部における軸索末端構造を解析し、シナプス総面積、

シナプスブトン数、軸索末端分岐数について体系的な解析を行い、これらのパラメーターが野生型と比べて変化する変異系統を多数同定した。さらに、RNAi 等による発現抑制により、軸索の微細分岐を制御する遺伝子機構機能解析を行い、シナプス形成変異が確かに当該遺伝子の変異によるものである事を確認した。同定された候補遺伝子について、シナプス構造の変化を分子レベルで明らかにするために、活性部位の形成、グルタミン酸受容体の発現、後シナプスタンパクの発現、さらに主要な細胞骨格結合因子の発現を解析し、形態的な変化の背景にあるシナプス制御タンパクの動態を明らかにした。本研究課題で明らかにした神経回路微細分岐を左右する遺伝子の多くは、ヒトにおいてさまざまな精神疾患に対する遺伝的リスク因子にも相同であり、ヒト脳の発生ならびに機能異常の理解にも重要な手がかりとなるものと思われる。

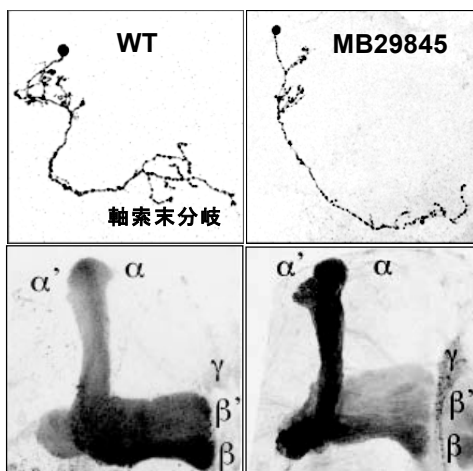


図 1 過剰発現による神経軸索分岐の遺伝子制御。MB29845 過剰発現のより、キノコ体の全体構造 (下段) には大きな異常が見られないが、野生型でみられる軸索末端の微細分岐 (上段) が顕著に抑制されている。

機能的可塑性解析のツールとして人工的記憶誘導系の開発。

軸索末端の微細分岐とシナプス形成制御機構の解析により明らかにした分子機構を脳高次機能と結びつけて解析するために、ショウジョウバエ幼虫を使用した人工的記憶誘

導系の開発を行った。神経活動操作技術の新転移より、青色光に反応するイオンチャネル (ChR2) と温度依存性イオンチャネル (dTrpA1) をそれぞれ特定のニューロンで発現させることで、可逆的に標的ニューロンを興奮させることが可能である。両技術の応用にあたり、ショウジョウバエの特定の嗅覚受容神経で ChR2 を発現する Or-ChR2 遺伝子と、報酬刺激を介するオクトパミン神経細胞で dTrpA1 を発現する Tdc2-dTrpA1 遺伝子を持つ遺伝子導入系統を構築した。遺伝学的交配により両者を合わせ持つショウジョウバエを作成し、自由行動下の生きた個体において、匂いと報酬刺激を、光と熱刺激にそれぞれ置換させることで人為的に嗅覚連合学習を誘導できる系を確立した。その結果、嗅覚受容器神経とオクトパミン作動性神経の選択的活性化が、幼虫脳における嗅覚連合記憶の形成に確かに充分であることが示された。また、単一種の嗅覚受容器神経のみを選択的活性化することで、複数種の受容器神経の活性化により誘導される自然記憶と区別つかない嗅覚記憶を誘起できることが示された。

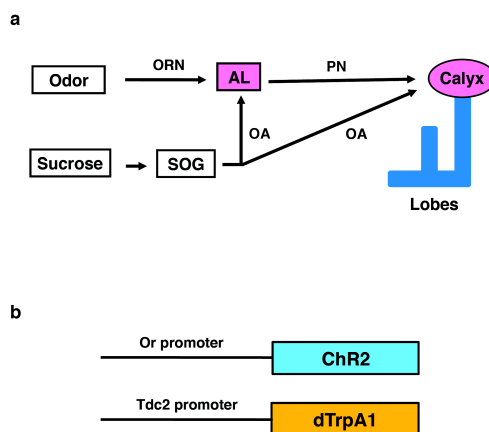


図 2 神経回路活性化による人為的記憶誘導系。報酬刺激を伝達するオクトパミン神経に温度感受性チャネル (OA-dTrpA1) を、匂い刺激を伝える嗅覚神経に光感受性イオンチャネル (ORN-ChR2) をそれぞれ発現させ、光と熱の外部照射により微細分岐遺伝子変異体において人工的連合記憶を誘導した。

(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)

1. Honda, T., Lee, C.-Y., Yoshida-Kashikawa, M., Honjo, K., and Furukubo-Tokunaga, K. (2014). Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of Single Olfactory Neurons in *Drosophila* Larvae. *Sci. Rep.* Apr 25;4:4798. doi: 10.1038/srep04798. (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. Honda, T., Yoshida-Kashikawa, M., and Furukubo-Tokunaga, K. Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of the Memory Circuits in *Drosophila* Larvae. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, U. S. A. 2014 年 11 月 17 日
2. Kurita, K., Pandey, H., Arai, Y., Yoshimura, Y., and Furukubo-Tokunaga, K. Genetical Interactions of Autism and Schizophrenia Risk Factor Genes in Glutamatergic Synaptogenesis in Fruit Flies. *European Conference on Neurobiology of Drosophila*, Crete, Greece. 2014 年 10 月 9 日
3. Honda, T., Lee, C.-Y., and Furukubo-Tokunaga, K. Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of the Memory Circuits in *Drosophila* Larvae. *Janelia Conference: Learning and Memory, a Synthesis of Bees and*

Flies, Ashburn, U. S. A. 2014 年 9 月 21 日

4. Kurita, K., Tanaka, D., Arai, Y., Furukubo-Tokunaga, K. *DISC1* genetically interacts with a mental retardation gene in glutamatergic synaptogenesis in *Drosophila*. 日本神経科学大会、パシフィコ横浜、横浜。2014 年 9 月 11 日
5. Pandey, H., Kurita, K., Yoshimura, Y., and Furukubo-Tokunaga, K. Genetical interaction of *DISC1* and autism spectrum disorder genes in fruit fly. 日本神経科学大会、パシフィコ横浜、横浜。2014 年 9 月 11 日
6. Honda, T., Lee, C.-Y., and Furukubo-Tokunaga, K. Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of the Memory Circuits in *Drosophila* Larvae. *Cold Spring Harbor Asia Conference: Neural Circuit Basis of Behavior and its Disorders*, Suzhou, China. 2014 年 5 月 14 日
7. Honda, T., Yoshida-Kashikawa, M., and Furukubo-Tokunaga, K. Induction of Associative Olfactory Memory by Targeted Activation of the Memory Circuits in *Drosophila* Larvae. Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, U. S. A. 2013 年 11 月 10 日
8. Honda, T., Yoshida-Kashikawa, M., and Furukubo-Tokunaga, K. Induction of Associative Olfactory

Memory by Targeted Activation of the Memory Circuits in *Drosophila* Larvae. International Workshop on Science and Patents 2013, Tsukuba, Japan. 2013年9月5日

9. Kurita, K., Tanaka, D., Pandey, H., Arai, Y., Ikejiri, K., Honda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. Modeling Schizophrenia in Flies: Direct Expression of *DISC1* Suppresses Neural Development in *Drosophila*. Asia Pacific *Drosophila* Research Conference, Seoul, Korea. 2013年5月15日
10. Honda, T., and Furukubo-Tokunaga, K. Optogenetic and Thermogenetic Activation of Memory Circuit in *Drosophila* Larvae. 5th Japan China Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan. 2012年9月22日
11. Kurita, K., Tanaka, D., Honda, T., Pandey, H., Arai, Y., Ikejiri, K., and Furukubo-Tokunaga, K. Direct Expression of a Schizophrenia Susceptibility Gene, *DISC1*, Suppresses Neural development in *Drosophila*. 5th Japan China Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Japan. 2012年9月22日
12. Kurita, K., Tanaka, D., Pandey, H., Takayama, K., Ando, T., Ando, M., Honjo, K., Mochizuki, H., Sawa, A., and Furukubo-Tokunaga, K. Modeling Schizophrenia in Flies: Direct Expression of *DISC1*, Alters Sleep Homeostasis and Impairs

Associative Learning in *Drosophila*. XIV European *Drosophila* Neurobiology Conference, Padova, Italy. 2012年9月5日

[図書] (計 1 件)

1. Furukubo-Tokunaga, K., Ludlow, Z. N., and Hirth, F. (2012). Memory circuits in *Drosophila*. in “*The Memory Mechanisms in Health and Disease*”, pp. 269–306. World Scientific, London, U. K.

[その他]

ホームページ

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~tokunaga/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古久保 克男 (徳永 克男)

(FURUKUBO-TOKUNAGA, KATSUO)

筑波大学・生命環境系・

教授

研究者番号：00272154