

研究報告書

「記憶タグとして機能するエピジェネティクスの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 平野 恭敬

1. 研究のねらい

ヒトを含めた動物は、記憶を獲得し、獲得した記憶を保持することで、生存に有利になるよう行動する。よく受け入れられているシナプスタグ仮説では、学習により活性化されたシナプ스에 タグが誘導されると説明している。そのタグが新たに発現したタンパク、例えば受容体を捕えることにより、記憶が獲得されると考えられている。しかし、獲得した記憶がどのように保持されるのか、記憶研究分野の大きな謎として残っている。私は、記憶保持にはヒストンアセチル化による持続的な遺伝子発現調節が必須であることを示唆するデータを得ていた。従ってシナプ스에 タグが存在するように、記憶を保持するため、核内にもエピジェネティクスという重要なタグ(記憶タグ)が存在するのではないかと考えた。

長期記憶に関与する遺伝子、およびシグナル伝達経路はショウジョウバエから哺乳類までよく保存されている。本研究では、哺乳類と同様の学習を行うことができるショウジョウバエをモデル生物として選択した。ハエでは網羅的 RNAi 系統が樹立されており、例えば記憶に関与するエピジェネティクスの制御因子を網羅的に探索することが可能である。またエピジェネティクス解析から得られた候補因子の、記憶における関与を調べるうえでもアドバンテージとなる。ショウジョウバエの脳内で、記憶を担う神経は全脳の 4%と考えられており、全脳の解析では記憶を保持する細胞で起きるエピジェネティクスの変化を検出することは困難である。私は 4%の記憶中枢の細胞核を単離する新しい手法を確立し、これを用いて記憶中枢で起きるヒストンアセチル化の変化を網羅的に解析することに成功した。本研究ではこの新規手法を活用し、記憶タグとして機能するアセチル化ヒストンを詳細に解析し、さらにアセチル化ヒストンの維持機構を解明することを目標とした。続いて、他のヒストン修飾も記憶タグとして機能するか、またそれらはアセチル化ヒストンと関連があるかを検証した。これらを明らかにすることで、エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶タグであるという新しい概念を提唱することを目指した。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、1:記憶タグとしてのヒストンアセチル化の詳細な解析、2:ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与、に焦点を絞った。

記憶タグとして機能するヒストンアセチル化の解析として、記憶保持に重要なヒストンアセチル化酵素の同定、それら標的遺伝子の同定、個々の標的遺伝子の機能を明らかにした。これらの結果より、実際にヒストンのアセチル化が記憶タグとして機能する仮説を支持できた。

ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御を明らかにするため、ショウジョウバエで明らかにしているエピジェネティクス因子を網羅的に機能阻害し、記憶に関与するものを同定し

た。この結果は、ヒストンアセチル化のみならず他のエピジェネティック制御を視野に入れた今後の解析が重要となることが示唆された。

本研究遂行過程で、本研究で取り扱った記憶保持に重要な転写因子 CREB/CRTC が空腹時に脳内で活性化し、空腹時の記憶形成を促進することを発見し、その詳細メカニズムを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ A「記憶タグとしてのヒストンアセチル化の詳細な解析」

ハエに匂いと電気ショックを同時に与えると(嫌悪学習)、その匂いを嫌いになる。ショウジョウバエの網羅的 RNAi 系統を活用し、嫌悪学習後の長期的な記憶の形成、さらに記憶の保持におけるヒストンアセチル化酵素を探索した。結果、CBP が長期記憶の形成に必要であること、また GCN5 と Tip60 が記憶の保持に重要であることを見出した(図 1)。エピジェネティクス因子が遺伝子発現を誘導するためには、転写因子が必要である。記憶の保持過程で重要な転写因子として、私は CREB/CRTC 複合体を同定した(図 1)。これらの標的遺伝子もまた記憶保持に必要であれば、上記の結果が強く裏付けられる。ヒストンアセチル化酵素と CREB/CRTC 標的を探索するため、私の確立した新規手法を用い、候補遺伝子を同定した。さらに RNAi 系統を用いた遺伝子の機能阻害により、実際にそれら遺伝子が記憶の形成過程、または保持過程に必要であることを明らかにした。

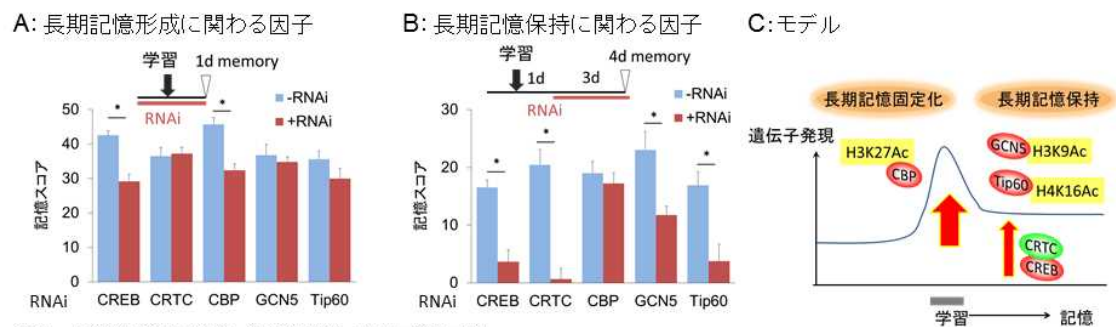
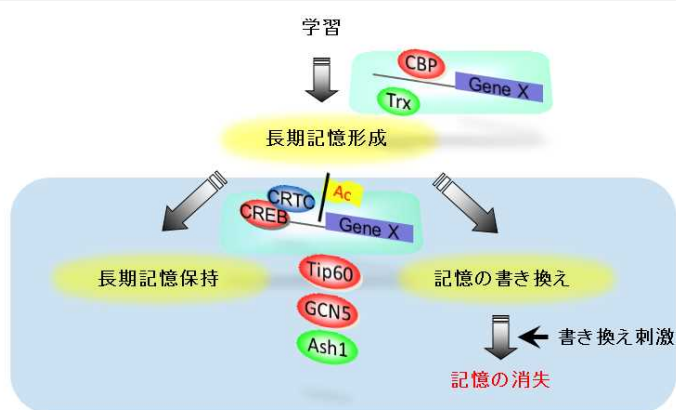


図1、長期記憶の形成、保持に関わる因子の同定

(A) 長期記憶の形成にはCREBとその結合因子CBP(ヒストンアセチル化酵素)が必要である。(B) 長期記憶の保持にはCREB/CRTCとヒストンアセチル化酵素であるGCN5とTip60が必要である。Gal4-UASシステムを改変したMBswを用いて、記憶中枢のキノコ体でのみ一過的にそれぞれ遺伝子のRNAiを誘導した。MBswはハエにRU(薬剤)を摂食させたときにキノコ体で発現誘導させるGal4系統である。(C) 長期記憶の固定化と保持に寄与するHATとCREB/CRTCのモデル。それぞれのヒストンアセチル化酵素は異なるヒストンのリジン残基(K)をアセチル化(Ac)する。(t-test: *P<0.05)

注: 記憶測定は、匂いを電気刺激と連合学習させ、匂いからの逃避行動(記憶)を測定する嫌悪条件付けを用いた。

学習に伴い記憶は作られるが、そのような記憶は間違いであることがあり、記憶の書き換えが必要になることがある。記憶の書き換えはどのような分子により制御されるのか、世界的に研究されていたがまだ分子レベルの理解に至っていない。CREB/CRTCの解析を進め



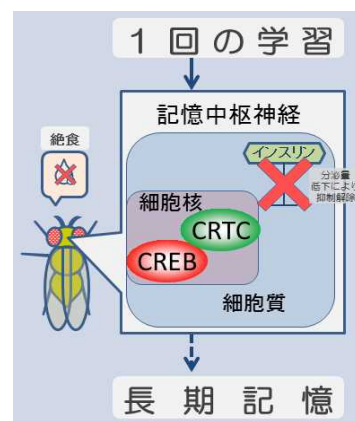
てみると、CREB/CRTC は記憶の保持とともに記憶の書き換えにも重要であることを見出した。従って、CREB/CRTCの標的遺伝子も記憶の書き換えに機能する可能性が示唆されました。上記の CREB/CRTC とヒストンアセチル化標的遺伝子の中に、記憶の書き換え遺伝子であるか検証したところ、記憶の書き換え遺伝子を同定することに成功した。以上のことから、ヒスタセチル化は当初の私の仮説通り、記憶の保持に重要であることに加え、記憶の書き換えにも必要であることがわかった。記憶の書き換え可能な時期は、学習後 4 日までに限定される。CREB/CRTC とヒストンアセチル化が協調することにより、記憶の書き換え可能な時期を限定され、1: 学習で得た情報が間違いならこの期間内に修正する、2: もし正しいなら一定期間後に CREB/CRTC とエピジェネティック制御が変化することで書き換え不可能にする、という合理的な 2 段階の制御が示唆された。

研究テーマ B「ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与」

上記と同様、嫌悪学習課題を用い、ヒストンアセチル化以外のエピジェネティック制御の関与を明らかにしようと試みた。ショウジョウバエで明らかになっているエピジェネティック制御因子 40 に関してそれぞれをノックダウンし、記憶に対する影響を調べた、その結果、ヒストンメチル化酵素 Trx、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6、ヒストン脱メチル化酵素 Lid が長期記憶の形成に必要であること、ヒストンメチル化酵素 Ash1、ヒストンユビキチン化酵素 UbcD6 が記憶の保持に重要であることを見出した。このうち、Trxと Ash1 が制御するヒストンメチル化について ChIP-seq 解析を行い、それらの標的遺伝子の候補を得た。ヒストンアセチル化標的として上記で同定したものとほとんど一致は見られず、長期記憶の形成、保持過程においてそれぞれのエピジェネティック制御が独立的に機能することが示唆された。今後、これらの経路を包括的に解析していく必要があるだろう。

研究テーマ C「空腹時の CREB/CRTC 依存的な長期記憶形成の促進」

上記の研究を進める過程で、下記のような新たな CREB/CRTCの機能を見出した。匂いと電気ショックを同時に与えた嫌悪学習後の長期記憶の形成には、1 回だけの学習では不十分で、繰り返し復習させる必要がある。一方、ハエに匂いと砂糖水を同時に与えると、ハエはその匂いが好きに



なる(報酬記憶)。しかしながら、報酬記憶は1回の学習でも長期記憶になることがわかっていった。なぜ報酬のみが1回の学習でも長期記憶になるのか、原因として、刺激が異なるため、使っている神経回路や神経伝達物質の違いが考えられた。しかし、報酬学習前に効率的に砂糖水を飲ませるため、ハエを空腹状態にしていた。実はこの空腹状態こそが1回だけの学習でも長期記憶が形成される要因なのではないかと考えた。実際に、空腹状態が報酬記憶のみならず、嫌悪記憶を促進することを発見した。過去の代謝組織における研究から、空腹時には血糖値が低下し、その結果、インスリンの分泌が低下すること、さらに転写因子である CREB/CRTC はインスリン低下により活性化することが示唆されていた。このようなインスリン低下に伴う CREB/CRTC の活性化が脳内でも起こり、長期記憶の形成を促進していることをつきとめた。また遺伝的に CRTC を脳内で活性化させたハエを構築したところ、このハエでは満腹でも記憶が促進された。このことから CREB/CRTC の活性化により記憶が促進されることが裏付けられた。以上より、空腹状態はインスリン活性を低下させ、その結果 CRTC が活性化し、1回の学習でも長期記憶を形成させることが明らかになった。

3. 今後の展開

本研究ではエピジェネティック制御が記憶形成、記憶保持に重要な記憶タグである仮説を検証した。記憶形成、および記憶保持に重要なエピジェネティクス因子とその動態、さらに記憶に重要なエピジェネティック因子の標的を同定したことにより、エピジェネティック制御が記憶タグとして機能する概念は提示することができる。今後、同定してきたエピジェネティクス因子、およびその下流因子の神経ネットワーク内での機能、時間的制御、さらに個々の因子の生理学的意義を追及していくことにより、エピジェネティック因子の神経における役割が明らかになるだろう。このように新しい概念からさらに本質的理解につなげることが今後の課題と見据える。また、ヒストンアセチル化、メチル化、ユビキチン化を包括的に解析することにより、記憶におけるエピジェネティック制御の理解が深まると考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究で、ヒストンアセチル化のみならず他のエピジェネティック制御が記憶形成、記憶保持に重要であることを見出し、またヒストンアセチル化標的遺伝子の記憶における詳細な役割を同定した。これらの結果から、当初の目的であったエピジェネティック制御が記憶タグとして機能するという仮説を強く示唆することができたと考える。脳という複雑な組織では、制御因子から責任因子まで到達することは困難であるが、本研究ではエピジェネティック制御因子からその標的因子の機能を明らかにすることができた。以上より、記憶研究分野のブレークスルーとなり、またエピジェネティクス研究分野の広がりにも貢献すると期待している。また、研究遂行過程で見出した空腹時の記憶促進に関して、当初の研究計画にはなかったが成果を報告することができた。以上の結果は、基礎科学における新規知見となるのみならず、高齢化社会の問題となっている認知症治療の創薬標的の提案につながるだろう。研究期間3年次より、新た

な研究室を立ち上げ、独自の研究をスタートさせることができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

エピジェネティクスは記憶保持に重要な記憶タグであるという新しい概念を提唱し、ショウジョウバエを用いてそれを検証した。長期記憶形成に重要なエピジェネティック因子(CBP, Trx, HDAC6, Lid)、及び記憶保持に重要な因子(GCN5, Tip609, Ash19, UbcD6)、ならびに記憶に重要なエピジェネティクス因子の標的遺伝子も同定した。上記の研究を進める上で記憶の保持に重要な転写因子としてCREB/CRTC複合体を同定している。この複合体は記憶の保持のみならず記憶の書き換えにも重要であることを見出した。また、この研究を進める過程で、CREB/CRTCの新たな機能も見出した。空腹になると記憶が促進するという事実を発見し、すでに報告している。これらの研究成果は当初の目的を十分達成し、顕著な成果である。今後は得られたエピジェネティクス因子の神経ネットワークにおける役割、ならびに生理的な意義を明らかにして行く必要がある。今後の展開を大いに期待している。本さきが在籍中に顕著な成果をだしており(発表、未発表データを含む)、研究者としての飛躍につながることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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**. 2013. 339:443-6.
2. Hirano Y, Saitoe M. Hunger and memory; CRTC coordinates long-term memory with the physiological state, hunger. **Commun Integr Biol**. 2013. 6, e25152.
3. 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 Y, Honda Y, Kodama Y, Masuda T, Saitoe M. Glial dysfunction causes age-related memory impairment in Drosophila. **Neuron**. 2014. in press.
4. Ueno K, Naganos S, Hirano Y, Horiuchi J, Saitoe M. Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured Drosophila brain. **J Physiol**. 2013. 591:287-302.
5. Hirano Y, Kuriyama Y, Miyashita T, Horiuchi J, Saitoe M. Reactive oxygen species are not involved in the onset of age-related memory impairment in Drosophila. **Genes Brain Behav**. 2012. 11:79-86.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- ・ **平野恭敬** 「エピジェネティクス解析から長期記憶分子メカニズムに迫る」 記憶回路研究会・個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解 生理学研究所 2014年10月8日
- ・ **平野恭敬** 「Decoding epigenetics related to distinct phases of long-term memory in Drosophila.」第37回日本神経科学大会 シンポジウム 神経発生・発達におけるクロマチン制御(epigenetic 制御)の役割 2014年9月12日
- ・ **平野恭敬** 「長期記憶に関わる遺伝子発現制御;ショウジョウバエから学べること」 SK (Shionogi-Kyoto University) プロジェクトシンポジウム (塩野義製薬) 2013年10月31日
- ・ **平野恭敬** 「高次脳機能を支えるエピジェネティクス;ショウジョウバエから学べること」 JST・NEDO 公開シンポジウム 2013年4月19日

受賞

- ・ 2012年度 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 若手優秀発表賞
- ・ 2013年1月22日 東京都医学研職員表彰

著作物

Hirano Y, Saitoe M. “Hunger-driven modulation in brain functions.”
(2014) *Brain Nerve*. 66, 41-48.

プレスリリース

「空腹状態になると記憶力があがる仕組みを発見」

2013/1/23 Science 誌に掲載の論文についてのプレスリリース

- ・ 平成25年1月25日掲載、日本経済新聞(38面)、「おなかがすくと記憶力アップ」
- ・ 平成25年1月27日掲載、毎日新聞(27面)、「空腹で記憶力アップ」
- ・ 平成25年1月25日掲載、読売新聞(16面)、「記憶力 空腹でアップ」
- ・ 平成25年1月25日掲載、東京新聞(30面)、「空腹時 記憶力アップ」
- ・ 平成25年1月25日掲載、共同通信(net)、「空腹で記憶力向上、ハエで実験 人も同じ？」