

トラウマ記憶の消去法確立に向けた神経遺伝学的研究

所属： 東京都立大学 理学研究科 生命科学専攻

助成対象者：坂井貴臣

共同研究者：上野耕平（東京都医学研究機構）

概要

動物が一度長期記憶を獲得すると消去することが極めて困難である。トラウマ記憶の治療のためにはこの問題を解決する必要がある。我々はこれまで、ショウジョウバエのトラウマ記憶の分子メカニズムの研究を行い、「トラウマ記憶を維持させないことで消去が可能になる」という治療原理が有効であると考えに至った。これまでの研究から、ハエの記憶中枢で光依存的に転写因子 CREB の転写活性が上昇する細胞で長期記憶が維持されていることを見出した。そこで我々は、光依存的な CREB の転写により記憶中枢ニューロンで発現が誘導される遺伝子の中から長期記憶の維持に必須な遺伝子を網羅的に同定する研究を計画し、その実現に向けて実験を行った。

abstract

Traumatic memories are difficult to treat because once a memory is acquired, it is maintained for a long time and is extremely difficult to erase. We have researched the molecular mechanisms of traumatic memories in *Drosophila* and have come to believe that the therapeutic principle of "erasing traumatic memories by preventing their long-term retention" is effective. In the fruitfly *Drosophila melanogaster*, we previously found that traumatic memory is maintained in brain neurons with a light-dependent increase in the transcription factor CREB in the memory center. Therefore, I planned a study to comprehensively identify genes whose expression is induced in the memory center by light-dependent transcription of CREB and which are essential for maintaining traumatic memory and conducted experiments to realize this project.

研究内容

<背景>

人を含む哺乳類では過度なストレスによるトラウマ記憶がオスの性的モチベーションを低下させることが知られている。遺伝学の発達したショウジョウバエ(以下,ハエ)でも同様の現象が知られている(求愛条件付け)。我々の研究室では、オスバエの求愛を利用した記憶測定法(求愛条件付け)により長期記憶に必須な遺伝子を同定してきた。求愛条件付けでは、既交尾メスとオスをつがわせて学習させる。オスはメスの性フェロモンに反応して求愛を開始するが(図1①)、一度交尾したメスは、求愛するオスに対して過度なストレス(性交拒絶、オスが忌避する匂い物質)を与える(図1②)。このメスからのストレス刺激に長時間さらされたオスは、その後、未交尾のメスとつがわせてもあまり求愛しなくなる(図1③)。よって、メスからストレスを受けたオスのトラウマ記憶により、オスの求愛モチベーションが低下すると考えられている(Inami et al., 2020)。過度なストレスによるトラウマ記憶がオスの性的モチベーションを低下させる現象は種を超えて保存されている。

トラウマ記憶モデルの1つであるマウスの「恐怖条件付け」において、トラウマ記憶の獲得には転写因子 CREB の活性化が関与する。

また、ハエのトラウマ記憶獲得にもマウス同様 CREB の活性化が必須である(Sakai et al., 2004; Inami et al., 2020)。しかし、獲得した記憶をどのように維持しているのか、そのメカニズムはよく分かっていない。さらに、すでに獲得されたトラウマ記憶を改善させる有効な治療法は未だ存在していない。

トラウマ記憶の治療が困難である理由は、この記憶を一度獲得すると消去することが極めて難しいことにある。この問題を解決するため、「トラウマ記憶を維持させないことで消去が可能になる」という治療原理が有効であると考えに至った。

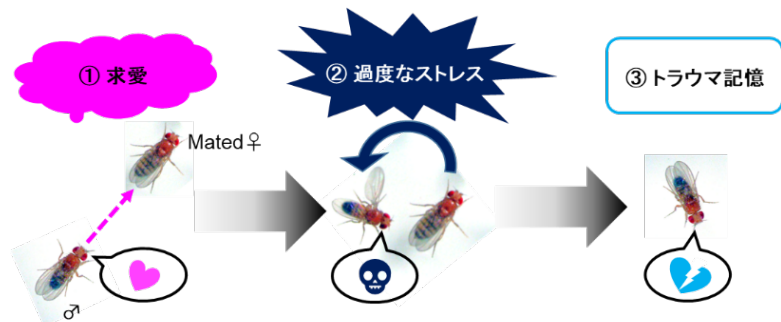


図1 求愛条件付けによる記憶の測定

<目的>

我々はこれまでに、求愛条件付け後に明暗サイクル条件下で飼育したハエではトラウマ記憶が長期間維持されるのに対し、恒暗条件下で飼育したハエではトラウマ記憶が維持されないことを見出した(Inami et al., 2020)。よって、ハエは環境光を利用してトラウマ記憶を維持していると考えられる。また、ハエ記憶中枢(キノコ体)における転写因子 CREB の活性化が記憶維持に必須であり、記憶中枢の CREB 転写活性も光依存的であることを見出した(Inami et al., 2020)。この発見は、光依存的に CREB の転写活性が上昇する細胞において、長期記憶を維持する遺伝子が発現していることを意味している。そこで私は、光依存的な CREB の転写によりキノコ体で発現が誘導

される遺伝子の中から長期記憶の維持に必須な遺伝子を網羅的に同定する研究を計画し、その実現に向けて実験を開始した。

<結果>

本研究では、記憶維持に機能している細胞のみを回収する方法を確立し、高精度な遺伝子発現プロファイリングを実現することが重要である。そこで、光依存的に CREB 活性が上昇する細胞に膜局在シグナルを付加した GFP (*mCD8::GFP*) を発現させ、磁性ナノビーズによる細胞回収技術を利用して *mCD8::GFP* 陽性細胞のみを回収することにした。本研究では、これらの実験系の実現に向けて、必要な形質転換システムをデザインし、複数のシステムの作製に成功した。

(1) 光依存的に CREB 転写活性が上昇する細胞の可視化

計画した形質転換バエのコンストラクトは以下の3つである：①6xCRE-FRT-stop-FRT-LexA 系統、②MB-FLP 系統、③LexAop-*mCD8::GFP* 系統(図2A)。①6xCRE-FRT-stop-FRT-LexA 系統は、CREB 活性を検出するためのコンストラクトである。CREB が活性化すると LexA::GAD の発現を誘導しようとするが、転写終結配列 (stop 配列) により転写は起こらない。stop 配列は 2 つの

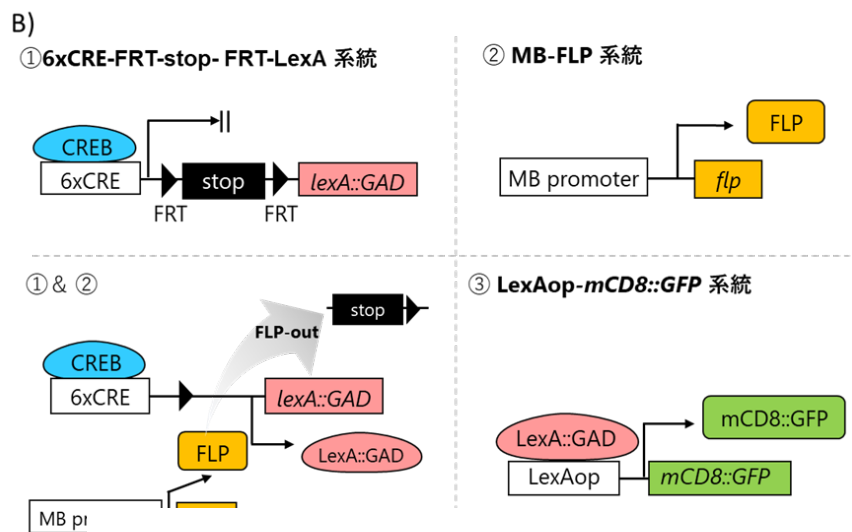
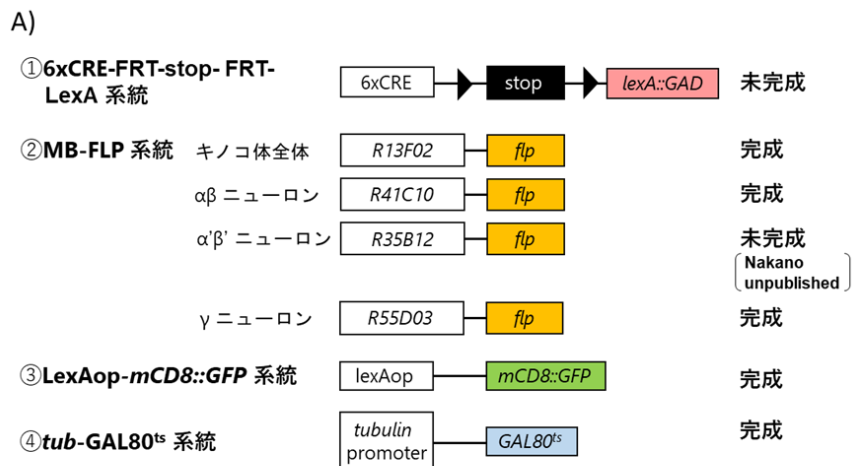


図 2

flippase recognition target(FRT)の配列の間に挟まれており、組み換え酵素である FLP が発現する細胞では FLP が FRT 配列を認識し、FRT-stop-FRT 配列を取り除く(図 2B、FLP-out)。

②MB-FLP 系統は、キノコ体(MB: mushroom body)で組み換え酵素である Flippase(FLP)を発現するコンストラクトである。したがって、6xCRE-FRT-stop-FRT-LexA 系統と組み合わせると、主にキノコ体で FLP-out が生じ、転写因子である LexA::GAD が発現する。①と②のハエに加えて③ LexAop-*mCD8::GFP* 系統を組み合わせると、LexA::GAD により *mCD8::GFP* が発現する。すなわち、CREB が活性化した細胞のみに *mCD8::GFP* が発現する。

これまでに、MB-FLP 系統を 2 系統(R13F02-FLP および R55D03-FLP)を作製し、それらの動作確認を行った。UAS-FRT-*mCherry*-stop-FRT-*mCD8::GFP*; *nSyb*-GAL4 を持つハエと各系統を交配した F1 を用いて実験を行った。これらの F1 個体では、全神経細胞で赤色蛍光タンパク質である *mCherry* が発現するが、キノコ体ニューロンで FLP が発現すればキノコ体は緑色蛍光を示すはずである。R13F02-FLP を持たないハエ(コントロール)では、脳神経系全体に *mCherry* の発現が確認できたが(図 7)、*mCD8::GFP* のシグナルは検出されなかった(図 3)。一方、R13F02-FLP を持つハエでは、キノコ体に *mCD8::GFP* のシグナルが検出された。よって、R13F02-FLP 系統によりキノコ体特異的なフリップアウトが可能であることが明らかになった。一方、R55D03(γ)-FLP 系統ではキノコ体における GFP が確認されなかった。

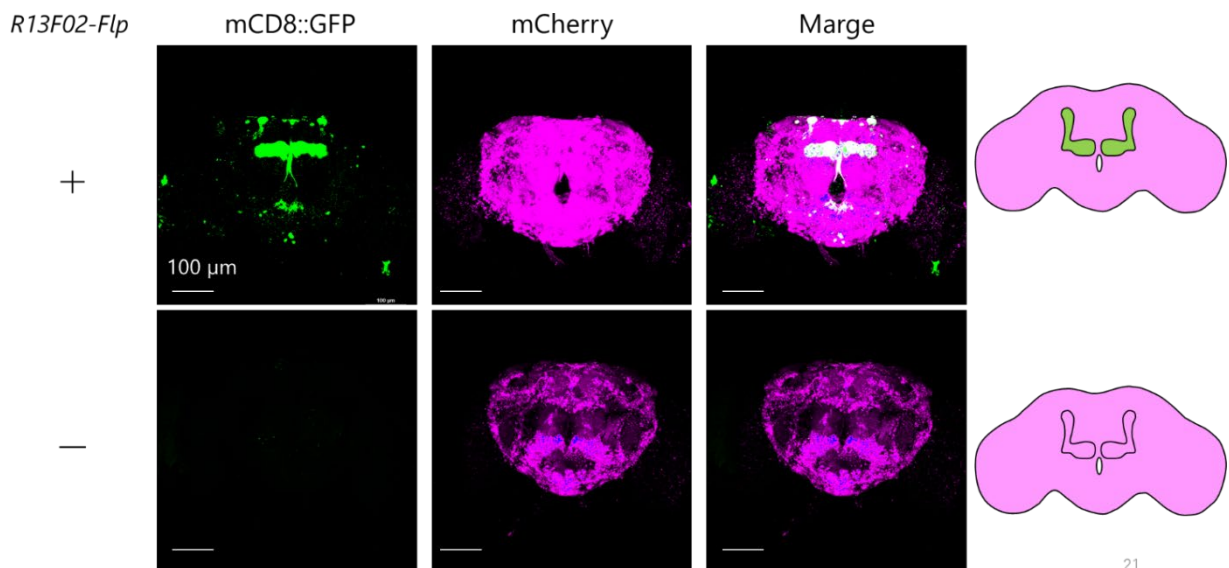


図 3

6xCRE-FRT-stop-FRT-LexA 系統に関しては、繰り返し配列が多く、予想以上にコンストラクト作製に時間がかかった。通常のクローニングでは作製が困難であったため、人工遺伝子合成により作製した配列をインジェクション用プラスミドに導入する方法に切り替えて現在コンストラクトの作成を進めている。

(2)磁石による細胞回収技術の確立

以下に示す細胞回収法の確立を目指した。(1) 膜局在シグナルである *mCD8* と GFP の融合タン

パク質 (mCD8::GFP) を記憶中枢特異的に発現させたハエの頭部を回収し、特殊なホモジェナイザーによりラフに粉碎することで脳のニューロンを分散させる。(2) さらに、ビオチン標識された mCD8 抗体を用いて記憶中枢ニューロンに磁性ナノビーズを付加し、磁石により mCD8::GFP 発現ニューロンのみを回収する。

実験法の確立のため、キノコ体細胞に mCD8::GFP を発現させたハエを用い、GFP 陽性細胞の回収を行ったところ、細胞回収に成功した(図4)。オスバエ 45 匹の頭をすりつぶし、少なくとも 456 個の mCD8::GFP 陽性なニューロンの回収に成功した。キノコ体の細胞は約 4,000/匹であるが、

R13F02-GAL4 系統では、全てのキノコ体細胞に GAL4 が発現しているわけではない。そのため、回収可能なニューロンの正確な数は不明ではあるが、456 個は極めて回収効率が低いと考えられる。今後は回収効率を上げるための更なる実験条件の検討が必要である。



図 4

<今後>

磁石による細胞回収において、細胞が粉碎されているものが多く観察されたため、この問題を解消する必要がある。現在使用しているものよりも、よりルーズなホモジェナイザーを使用してハエ脳をホモジェナイズする必要がある。2021 年度 4 月に特殊なホモジェナイザーを発注したものの、コロナの影響で納品が延期になり、当初予定の実験を完了することができなかった。今後は、この新しい特殊なホモジェナイザーを用いた条件検討を行い、より回収効率が高い方法を確認する必要がある。

磁石による細胞回収のほかに、目的の細胞を回収する方法はフローサイトメトリーを利用した Fluorescence activated cell sorting (FACS) がある。FACS での細胞分離は、シングルセル解析や空間トランスクリプトームなどを行う過程で用いられている。細胞の分離は、フローサイトメトリーで測定した蛍光の情報をもとに、セルソーターを用いて行われる。この時の蛍光の情報は、測定する液滴に含まれる細胞により決まる。ハエの細胞は、マウスなど哺乳類の細胞よりも小さいため、FACS を用いた細胞回収では、液滴に含まれる目的の細胞の割合が低くなる。一方、磁石による細胞回収は、大きさによる制限がないため、ハエにも適用できる。また、FACS のような機器を必要としないため簡便に行うことができる。今後、遺伝学的ツールの発達したハエで磁気特異的な細胞回収の技術を確認できた場合、遺伝学的ツールとの組み合わせにより、細胞特異性の高い遺伝子発現解析を行えると考えられる。

引用文献

(1) *Sakai T, Tamura T, Kitamoto T and Kidokoro Y

A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) 101: 16058-16063.

(2) Inami S, Sato S, Kondo S, Tanimoto H, Kitamoto T, and *Sakai T.
Environmental light is required for maintenance of long-term memory in *Drosophila*. **J. Neurosci.** 40 (7) 1427-1439. [Impactfactor 2019 = 6.07]

本助成に関わる成果物

[論文発表]

(1) Yuki Suzuki, Yuto Kurata, Takaomi Sakai
Dorsal-lateral clock neurons modulate consolidation and maintenance of long-term memory in *Drosophila*. **Genes to Cells** 2022 Apr 27 (4) 266-279. doi.org/10.1111/gtc.12923

(2) Show Inami, Tomohito Sato, Yuto Kurata, Yuki Suzuki, Toshihiro Kitamoto, *Takaomi Sakai.
Consolidation and maintenance of long-term memory involve dual functions of the developmental regulator Apterous in clock neurons and mushroom bodies in the *Drosophila* brain. **PLoS Biol** 2021 Dec 3;19(12):e3001459. doi: 10.1371/journal.pbio.3001459.

[ポスター発表]

・佐藤 岳仁, 坂井貴臣(2021)ショウジョウバエが長期記憶維持に用いる光依存的なニューロンの探索 第44回日本神経科学大会 7月31日 兵庫 神戸(WEB参加)

・佐藤 智士, 坂井貴臣(2021)ストレス依存的な性的モチベーション低下のショウジョウバエモデルの解析 第44回日本神経科学大会 7月31日 兵庫 神戸(WEB参加)

・Yuki Suzuki, Takaomi Sakai (2021) *period*-expressing dorsal lateral neurons' neural activity is necessary for memory maintenance in *Drosophila* long-term memory. 第44回日本神経科学大会

[その他]

プレスリリース

共同通信 PRWire 「体を形作る遺伝子が脳で記憶を根付かせることを発見！」

<https://kyodonewsprwire.jp/release/202112034411>