

133. 記憶形成システムの恒常性維持機構の解明

殿城 亜矢子

千葉大学 大学院薬学研究院 生化学研究室

Key words : インスリン, 老化, 脂肪組織, 嗅覚記憶, ショウジョウバエ

緒言

老化に伴う代謝恒常性の破綻は糖尿病など多くの障害を引き起こすが、学習や記憶を担う脳機能の障害にも関連することが知られている。また、インスリンシグナルの調節が異常となる糖尿病は、認知症など記憶障害の危険因子であることが示唆されている。ショウジョウバエから哺乳類まで高く保存されているインスリン/インスリン様成長因子シグナリング (IIS) は、発生や成長、代謝、老化を含む様々な生理機能を調節するが、学習や記憶の獲得・維持を司る脳機能にも必要であることが知られている。しかし、IIS が学習や記憶にどのように関与しているのか、また老化に伴う記憶低下への IIS の関与は未だ解明されていない。本研究はショウジョウバエをモデルとして IIS に着目し、老化に伴って記憶が低下するメカニズムの解明を目的として研究を行った。

方法、結果および考察

1. インスリンシグナルは中期記憶に必要である

ヒトのインスリンは膵臓のランゲルハンス島 β 細胞から放出されるのに対し、ショウジョウバエでは脳に存在するインスリン産生細胞 (IPC) からインスリン様ペプチド (Dilp) が分泌される。まず、IPC から分泌される Dilp が記憶の形成に必要であるか確かめるため、IPC 機能を欠損させた個体における記憶の測定を試みた。IIS は発生や成長を含む様々な時期や組織において重要な役割を果たすため、薬剤依存的に発現を調節できる Gene Switch (GS) システムを用いて IPC 機能を一過的に欠損させた個体を作製した。それらの個体を用いて嗅覚記憶を測定したところ、IPC 機能欠損させた群でのみ中期記憶の低下が見られた (図 1A、1B)。このことより、IPC の機能は中期記憶に必要であることが明らかとなった。

老化に伴う記憶低下は様々なモデル動物において観察されるが、ショウジョウバエ嗅覚記憶では中期記憶が低下することが知られている^{1,2)}。そこで、老化に伴う中期記憶低下の原因の一つとして老化に伴う IPC 機能欠損の可能性を考えた。老齢個体において同様の手法を用いて IPC 機能を一過的に欠損させたところ、中期記憶のさらなる低下は見られなかった (図 1A、1B)。これらのことより、老化に伴う IPC 機能の欠損が中期記憶の低下を引き起こしている可能性が示唆された。

IPC に発現する Dilp2、3、5のうち中期記憶に必要な Dilp を同定するために、それぞれの Dilp を IPC でノックダウンさせた個体を作製し記憶を測定した。IPC 特異的に Dilp3 をノックダウンした個体では中期記憶の有意な低下が見られたが、Dilp2 や Dilp5 のノックダウン個体では記憶への影響は見られなかった (図 1C)。このことより、IPC に発現する Dilp3 が中期記憶の形成に必要であることが示唆された。

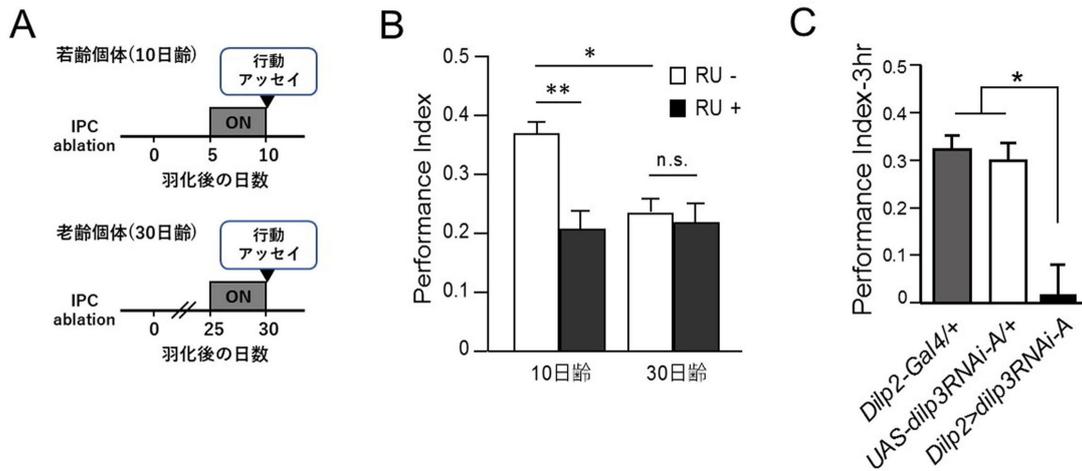


図1. インスリンシグナルは中期記憶に必要なである

A) 若齢個体として用いた 10 日齢のハエと、老齢個体として用いた 30 日齢のハエそれぞれにおける、RU486 投与と記憶アッセイのタイムコース。

B) 若齢個体の IPC において細胞死誘導される群 (RU+) の 3 時間記憶のスコア (PI) は、コントロール群 (RU-) に対し有意に低下した ($p < 0.001$, $n > 12$)。10 日齢に比べて 30 日齢では PI が有意に低下する ($p < 0.05$) が、IPC での細胞死誘導は 30 日齢において有意に低下しない ($p = 0.98$, $n = 13$)。二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った。用いたハエ: *Dilp2-GeneSwitch/+; UAS-reaper/+*。

C) IPC で *dilp3RNAi* を発現しているハエ (10 日齢) におけるトレーニング 3 時間後の記憶 (黒) はコントロール群 (白、グレー) に対して有意に低い ($p < 0.005$, $n > 6$)。一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った。用いたハエ: *Dilp2-Gal4/+*, *UAS-dilp3RNAi/+*, *Dilp2-Gal4/UAS-dilp3RNAi*。

2. *dilp3* の発現は加齢に伴い低下する

老化に伴う IPC における *dilp* の転写調節の影響を明らかにするために、野生型ハエの若齢・老齢個体における *dilp2*、*dilp3*、*dilp5*、*inR* の発現量を定量 PCR により検討した。*dilp2*、*dilp3*、*dilp5* は IPC の存在する頭部で発現が確認されるが、胸部や腹部での発現は見られなかった。一方で、*inR* は頭部、胸部、腹部ともに発現が見られた。また、*dilp2*、*dilp5*、*inR* の発現は老化により変化がみられなかったが、*dilp3* の発現は老齢個体で有意な低下が見られた (図 2A-C)。また、IPC における Dilp2、Dilp3 の発現を免疫染色により確認したところ、Dilp3 のみの発現低下がみられた (図 2D)。これらのことより、*dilp3* の発現は転写、タンパク質レベル両方で、加齢に伴い低下することが明らかとなった。

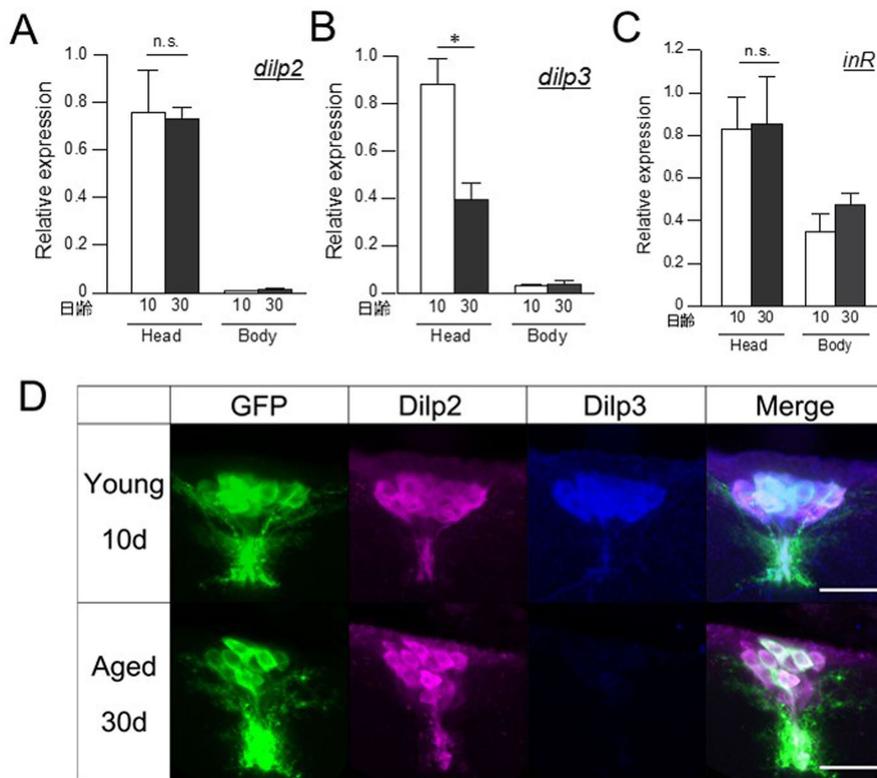


図 2. *dilp3* の発現は加齢に伴い低下する

A~C) 老齢個体では若齢個体に比べて *dilp2*, *inR* の発現は変化しないが *dilp3* の発現は低下する (* $p < 0.0005$, Student's t-test)。定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) で野生型 *CantonS* における各遺伝子の相対的発現レベルを測定し、10 日齢と 30 日齢を比較した。それぞれ $n = 3$ 。

D) IPC に GFP を発現する若齢個体・老齢個体の脳を Dilp2 抗体と Dilp3 抗体で染色した IPC 拡大図。Dilp2 は若齢個体・老齢個体で染色が見られるが、Dilp3 の染色は老齢個体で顕著に低下した。

3. 中期記憶の形成に脂肪組織のインスリン受容体が必要である

ショウジョウバエの Dilp は 8 種類知られているが、インスリン受容体 (InR) は 1 種類のみ同定されており、神経細胞、グリア細胞、脂肪細胞を含む様々な組織に発現している。どの組織における InR の発現が中期記憶に必要なかを明らかにするために、様々な組織特異的に InR ドミナントネガティブを一過的に発現させた個体を作製し中期記憶を測定した。その結果、脂肪細胞特異的に InR ドミナントネガティブを一過的に発現させた個体において、短期記憶は変化しないが中期記憶が有意に低下することが明らかとなった (図 3A、3B)。一方で、神経細胞やグリア細胞特異的に InR ドミナントネガティブを一過的に発現させた個体では、中期記憶の顕著な変化が見られなかった (図 3C、3D)。このことより、脂肪組織におけるインスリン受容体の発現が中期記憶の形成に必要なことが示唆された。

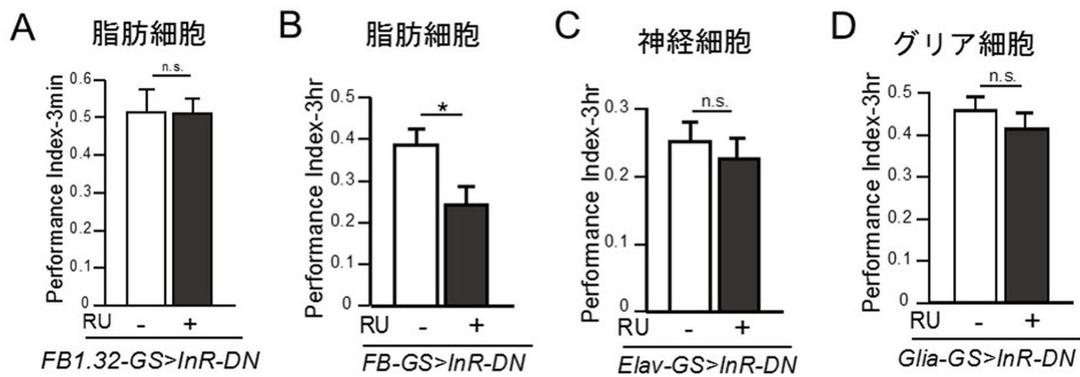


図 3. 中期記憶の形成に脂肪組織のインスリン受容体が必要である

A、B) 脂肪細胞で InR のドミナントネガティブを発現するハエ (RU+) における 3 時間記憶ではコントロール群 (RU-) と比べて記憶が有意に低下する (* $p < 0.05$, $n > 8$, Student's t-test) (B) が、3 分後の記憶では変化しない ($p = 0.98$, $n > 8$) (A)。用いたハエ: *FatBody-GeneSwitch/UAS-InR-DN*。

C) 全ての神経細胞で InR のドミナントネガティブを発現するハエ (RU+) における 3 時間後の記憶はコントロール群 (RU-) と比べて記憶は有意に低下しない ($p = 0.53$, $n > 11$, Student's t-test)。用いたハエ: *Elav-GeneSwitch/UAS-InR-DN*。

4. Dilp3 の一過的な強制発現は中期記憶を増強する

これまでの結果より、IPC における *Dilp3* の発現が中期記憶に必要であること、*dilp3* の発現は老化に伴い低下することが明らかとなった。そこで、老齢個体における中期記憶の低下が *dilp3* の強制発現により向上する可能性を検討した。若齢個体と老齢個体の IPC に *dilp3* を一過的に発現させ中期記憶を測定したところ、若齢個体と老齢個体のどちらでも *dilp3* 過剰発現群において中期記憶の有意な上昇が見られた (図 4A、4B)。

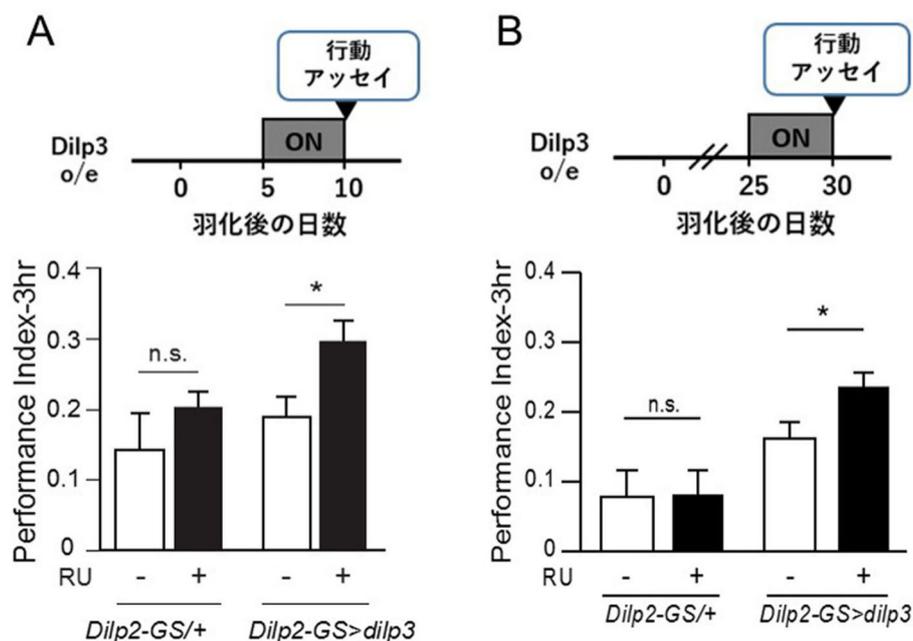


図 4. Dilp3 の一過的な強制発現は中期記憶を増強する

A) 10 日齢の *Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3* において IPC で *dilp3* が誘導される群 (RU+) の 3 時間記憶の PI は、コントロール群 (RU-) に対して有意に増加する (* $p < 0.05$, $n = 8$)。グラフの上図は 10 日齢のハエにおける、RU486 投与と記憶アッセイのタイムコース。B) 30 日齢の *Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3* において IPC で *dilp3* が誘導される群 (RU+) の 3 時間記憶の PI は、コントロール群 (RU-) に対して有意に増加する (* $p < 0.05$, $n > 11$)。二元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った。グラフの上の図は 30 日齢のハエにおける、RU486 投与と記憶アッセイのタイムコース。用いたハエ: *Dilp2-GeneSwitch/+*, *Dilp2-GeneSwitch/UAS-dilp3*。

本研究では、様々な時期・組織で機能する IIS を遺伝学的に一過的に改変させることで、IIS の記憶への特異的な影響を検討した。これらの結果より、IPC からの Dilp3 分泌や脂肪細胞における IIS を介して中期記憶が調節されること、IIS の調節異常が老化による記憶低下に寄与していることが示唆された³⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院の伊藤素行である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文献

- 1) Tonoki A, Davis RL. Aging impairs intermediate-term behavioral memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Apr 17;109(16):6319-24. doi: 10.1073/pnas.1118126109. Epub 2012 Apr 2. PubMed PMID: 22474396; PubMed Central PMCID: PMC3341014.
- 2) Tonoki A, Davis RL. Aging impairs protein-synthesis-dependent long-term memory in *Drosophila*. *J Neurosci*. 2015 Jan 21;35(3):1173-80. doi:10.1523/JNEUROSCI.0978-14.2015. PubMed PMID: 25609631; PubMed Central PMCID: PMC4300323.
- 3) Tanabe K, Itoh M, Tonoki A. Age-Related Changes in Insulin-like Signaling Lead to Intermediate-Term Memory Impairment in *Drosophila*. *Cell Rep*. 2017 Feb 14;18(7):1598-1605. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.053. PubMed PMID: 28199832.