

# 記憶をコードするエピジェネティック因子の同定

京都大学 物質-細胞統合システム拠点  
杉 拓磨

## 1. はじめに 目的

環境からの刺激に対し、ゲノム配列の変化を伴わない、クロマチンやDNAの化学修飾による後天的な遺伝子発現調節をエピジェネティクスという。生物の記憶は、遺伝子発現変化を伴うことが知られ、かつ、出生後の様々な環境要因に伴い変化することから、近年、エピジェネティックな記憶制御の可能性が唱えられている。本研究者は、1細胞レベルでの分子解析が唯一可能な線虫 *C. elegans* の記憶がエストロゲン受容体 (ER) と cAMP 反応性エレメント結合タンパク質 CREB による核内制御を受けることを示した (Sugi et al, *Nature Neuroscience*, 2011; Nishida, Sugi (Co-first) et al, *EMBO reports*, 2011)。ER と CREB はエピジェネティックな遺伝子発現調節に深く関わることをもとに、クロマチンリモデリングファクターとして知られる ISW-1 が *C. elegans* の振動記憶に関わる可能性を見出した。本研究では、これらの独自の結果を切り口に、記憶を制御するエピジェネティクスを同定・可視化し、記憶の仕組みとその異常による神経疾患の要因を本質的に理解することを目指した。

## 2. 方法

記憶を簡便に定量化するための装置を開発し、遺伝学的手法による記憶を担う細胞の同定を行った。生化学的手法および分子生物学的手法により、振動記憶の形成に関わるメカニズムを解析した。

## 3. 結果 研究成果

*C. elegans* は振動を感じると、通常、忌避的に後ずさりの移動を行うが、定期的な振動刺激によるトレーニングを行うと、振動に慣れ、記憶するので、24時間後に再び振動を与えても、後ずさりの移動距離の顕著な減少・消失が見られる。したがって、トレーニング前後において、振動に対する後ずさりの距離を計測することにより、記憶を定量化できると考えた。そこで、まず、以下の点に留意して、この記憶を定量化する装置を開発した。

- ・ トレーニング過程において、振動刺激を定期的に精度よく同時に複数の線虫集団 (約30個体を9群) に全自動で与える。
- ・ 刺激を受けた複数の線虫集団の全ての移動距離を同時に測り、数値化する。
- ・ 細胞特異的に遺伝子を導入した線虫 (トランスジェニック線虫) が発する蛍光を検出、その遺伝子を持たない線虫 (非トランスジェニック線虫) が混在する中から自動で識別する。

この装置を用い、まず、ほ乳類の記憶形成の目印として知られる、転写因子 CREB のリン酸化が、神経回路内のどの神経細胞で起こっているのかを確認した。その結果、2つの介在神経細胞 AVA と AVD で CREB のリン酸化を阻害した場合に、*C. elegans* の記憶が異常となることが明らかになった。この結果から、AVA と AVD の2つの神経細胞で記憶が保持されていると考えられた。

次に遺伝子発現機構に着目し、CREB の発現機構をもとに、種々の解析を行った。遺伝子発現発現には、通常、ヒストンの修飾が関わる。特に、ヒストン H3 の4番目リジンのトリメチル化 (H3K4me3) は遺伝子発現促進のマーカーとして知られる。当初、ウエスタンブロッティングにより、線虫の記憶依存的に H3K4 の脱メチル化が行われるかどうかを検証した。しかしながら、

H3K4のトリメチル化は線虫の個体全身で極めてユビキタスに観測されることもあり、記憶に依存して変化するH3K4の脱メチル化のみをウエスタンブロットティングにより検出することはできなかった。そこで、発想を転換し、線虫において、H3K4をトリメチル化することが知られるメチル基転移酵素SET-2に着目した。過去の海外のグループの研究からSET-2の欠損株においては、H3K4のトリメチル化が大きく減弱していることが明らかになっていた (Greer et al. 2012)。そこで、SET-2の欠損株を利用し、解析を行った結果、このSET-2欠損株において、記憶が異常になる可能性が示唆された。次に、このメカニズムに関わる因子を調べた。ISW-1はH3K4のトリメチル化に依存して、クロマチンのリモデリングを行うことも知られている。そこで、ISW-1のドミナントネガティブフォームを用いた行動実験を行った結果、振動記憶ニューロンAVAとAVDに特異的にISW-1のドミナントネガティブフォームを発現させた場合において、顕著な行動異常が確認された。

実際に、H3K4のトリメチル化がAVAとAVDの2つの神経細胞で起こっていることを確認する必要があると考えた。そこで、同定された因子の役割をさらに詳細に検討するため、高分解能の顕微鏡を用い、1ニューロンレベルの核内構造変化を捉える系を構築した。詳細な条件検討の結果、野生株において、単一ニューロンのH3K4のメチル化を検出する系を確立することに成功した。さらに、解析の結果、野生株において、遺伝子発現のマーカーであるヒストンH3のK4トリメチルがヘテロクロマチン近傍に寄り添うように局在していることが明らかになった。今後、FISH解析などにより、記憶過程において、H3K4のメチル化を追跡することで、より詳細なメカニズムを可視化できると考えている。

#### 4. 考察 まとめ

まず、本研究により、線虫*C. elegans*の馴化学習記憶現象のハイスループットな定量化解析系を開発した。さらに、この装置を利用して解析を行った結果、SET-2とISW-1が記憶形成に関わる可能性が得られた。現在、AVAニューロンのヒストン修飾の変化を捉えるため、顕微鏡を用いた免疫染色による解析を行っている。

#### 5. 発表論文、参考文献

**Takuma Sugi**<sup>\*,#</sup>, Tetsushi Sakuma<sup>#</sup>, Yasuko Ohtani, Takashi Yamamoto

(\*: Corresponding author, #: Equal contribution)

“Versatile strategy for isolating transcription activator-like effector nuclease-mediated knockout mutants in *Caenorhabditis elegans*”

***Development Growth Differentiation*** in press