

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07145

研究課題名(和文) 単一ケニオン細胞に対する古典的条件付けとその成立に関する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the classical conditioning with an isolated Kenyon cell

研究代表者

吉野 正巳 (YOSHINO, Masami)

東京学芸大学・教育学部・名誉教授

研究者番号：20175681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：フタホシコオロギのキノコ体から、単離した大型ケニオン細胞の細胞体に対し、条件刺激(CS)であるアセチルコリン(ACh)、無条件刺激(US)である報酬物質、オクトパミン(OA)を2本の微小ピペットから微小圧力注入法で、対投与(CS-US)した。学習の標的分子としてNa+活性化K+チャンネルを取り上げ、Cell-attached patch clamp モードでその活動を継続記録した。複数回のCS-US対刺激を与えた所、その後の1回のCS刺激でチャンネル活動の抑制が観察された。この抑制に、CS経路とUS経路のシグナル伝達間クロストークが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：I examined whether associative learning could be performed at the level of single isolated Kenyon cell from the cricket mushroom bodies. Pressure ejection of acetylcholine (ACh) and octopamine (OA) via drug-filled pipettes was used as a conditioned stimulus (CS) and an unconditioned stimulus (US), respectively. As a possible target molecule during CS-US pairing conditioning, Na⁺-activated K⁺ (KNa) channels were used. The present results showed that 5 trial CS-US paired conditioning caused an alteration of responsibility of KNa channels to ACh. This alteration was not observed when backward pairing (US-CS) of the conditioning was used. This alteration was also not observed in the presence of NOS inhibitor, IP3 receptor inhibitor, PKG inhibitor, and PKA inhibitor in the bath solution. These results indicate that the cross-talk between NO/cGMP/PKG signaling and cAMP/PKA signaling may play an important role in the alteration of the responsibility of KNa channels to ACh.

研究分野：神経生理学

キーワード：classical conditioning Kenyon cell ion channel acetylcholine octopamine

1. 研究開始当初の背景

Mizunami, Matsumoto らはフタホシコオロギを用いた行動薬理学的研究によって、匂いと味の連合学習に関わる生化学経路に関する仮説を世界で最初に提唱した(2008)。コオロギの嗅覚学習においてオクトパミン(OA)及びドーパミン(DA)を神経伝達物質とするニューロンが報酬及び罰の情報を伝えることが明らかにされた。コオロギに対する1回の条件付けで短期記憶が成立し、複数回の条件付けにより長期記憶が形成される事、さらに短期記憶から長期記憶への移行過程に、一酸化窒素(NO)シグナル伝達系が関与している可能性が示された。現在、フタホシコオロギは、ゲノム解析がなされ、記憶研究のモデル生物として世界で広く用いられるようになっていく。

研究代表者は昆虫の記憶中枢であるキノコ体の内在ニューロンであるケニオン細胞(大型サイズ)の膜興奮性に関わる主要イオンチャネルを同定した。また異種イオンチャネル間の機能結合の存在、活動電位の背景チャネルの解析を行なった(Inoue et al. 2014)。また同定チャネルに対する、アセチルコリンとモノアミンの修飾作用から神経伝達物質受容体の存在を明らかにした。ガス状分子、一酸化窒素(NO)とその下流シグナル伝達系の各イオンチャネルに対する作用も明らかにした。

上記の研究結果から、フタホシコオロギの大型ケニオン細胞は、その細胞体上に、条件刺激(CS)と無条件刺激(US)を受容する受容体とその下流のシグナル伝達経路を備えており、細胞体上での連合学習が可能なモデル細胞として実験的アプローチが可能であると判断できた。そこで、キノコ体から急性単離し、脱分化のおこっていないケニオン細胞に対し、個体レベルで適用された「古典的条件付け」のパラダイムを適用し、単一細胞においても、複数回の条件付けにより、学習が成立する可能性を検証する実験を企画した。

2. 研究の目的

学習・記憶の基礎は、シナプス発芽やシナプスにおける信号伝達効率の可塑的变化に起因する神経回路の機能変化であると考えられている。Tonegawaらは、オプトジェネテイクス手法を用いて記憶エンGRAMニューロン群を人為的に活性化できることを示し、記憶研究の新たな解明の道を開拓している(Xu Liu et al., 2012)。しかし、神経回路から切り離された個々のニューロンが潜在的に持つ学習・記憶能力を実験的に示した研究は少ない。

ゾウリムシは、単細胞生物でありながら、音刺激と電気ショックを連合させる学習能力を持つことが知られており、学習・記憶が一つの細胞に備わった基本的性質である可

能性を示唆している。

本研究はフタホシコオロギのキノコ体から、急性単離した1個のケニオン細胞が内在的に持つ学習・記憶能力を、人為操作による条件付けによって引き出し、単一細胞の持つ学習・記憶能力の分子基盤を明らかにしようとするものである。

現在、記憶研究は、コネクトーム研究に代表される、神経ネットワークの解明を中心に推進されている。本研究は、神経ネットワークの下層要素である単一ニューロンのレベルであっても、その内部には上層である神経ネットワークに匹敵する外界及び内界に関する情報が、入れ子構造として分子間ネットワークの形で存在しているとの仮説をたて、その実態を解明することを目的とした。フタホシコオロギのキノコ体を構成する大型ケニオン細胞の細胞体は、この研究のsemi-physiologicalなモデル細胞として有益であり、分子間ネットワークの解明は、下層にはなく上層に独自な特徴として出現する、創発的性質の実態を知る上でも重要な貢献をすることが期待される。本研究は、個体レベルで適用されている「古典的条件付け」を、脳組織から解離し、in vivoで見られるシナプス入・出力構造を持たない単一ニューロンの細胞体に適用し、学習を成立させることが可能か否かを実験的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

フタホシコオロギのキノコ体から酵素処理によって急性単離した大型ケニオン細胞の細胞体に対し、条件刺激(CS:アセチルコリン、ACh)と無条件刺激(US:オクトパミン、OA)を細胞体に接近させた2本の微小ピペットから、1秒間、微小圧力注入法で与えた。学習の評価には、ケニオン細胞の膜興奮性に重要な役割を果たしているNa⁺活性化K⁺チャネルの開口確率変化を用いた。単一チャネル活動記録にはパッチクランプ法のCell-attached patchモードを適用した(図1)。

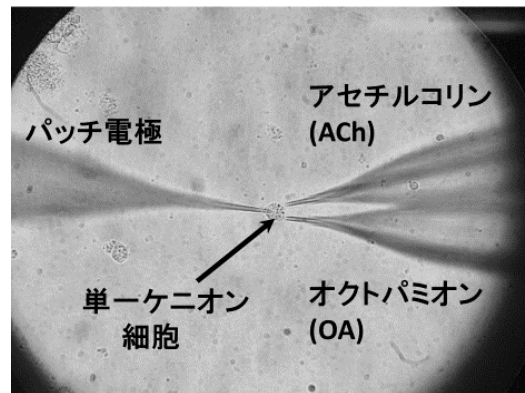


図1 単一ケニオン細胞へ接近させた2本のCS(アセチルコリン)及びUS(オクトパミン)刺激のための微小ピペットと単一K⁺チャネル記録のためのパッチ電極

4. 研究成果

(1) Na⁺活性化 K⁺チャンネルの単一チャンネル活動を継続モニターしながら CS-US の対刺激を 30 秒おきに 5 回与えた(図の)ところ、その後の 1 回の CS 刺激(図の)に対し、チャンネル活動の抑制が観察された(図 2)。

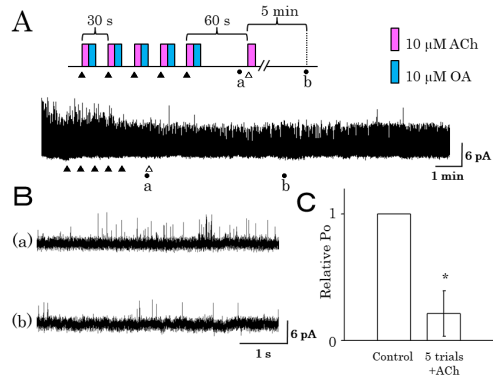


図 2 単一ケニオン細胞に対する CS (アセチルコリン:ACh) - US (オクトパミン:OA) 対刺激後の Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率変化。A: 上段は、CS-US, CS 刺激の模式図。B,C: 5 回の条件付け後、ACh 投与 (CS) により Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率が減少する。

(2) この抑制は、CS あるいは US 単独の複数回刺激、1 回の CS-US 刺激、及び CS-US の順序を逆にした 5 回の US-CS 刺激後(図 3)では観察されなかった。

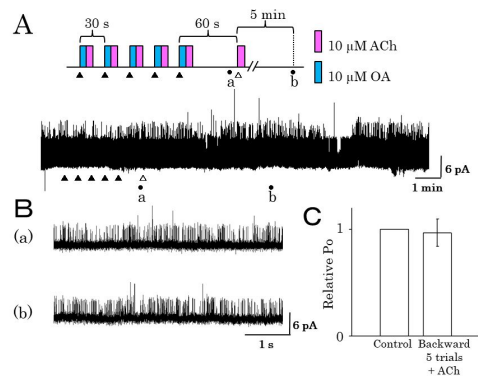


図 3 単一ケニオン細胞に対する US-CS 対刺激後の Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率変化。A: 上段は、US-CS, CS 刺激の模式図。B,C: 5 回の条件付け後、ACh 投与 (CS) により Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率は変化しない。

(3) NOS 抑制剤の L-NAME (図 4)、IP₃ 受容体抑制剤の 2-APB (図 5)、PKG 抑制剤の KT5823、PKA 抑制剤の H-89 (図 6)存在下では、5 回の CS-US 対刺激後に見られる抑制は観察されなかった。

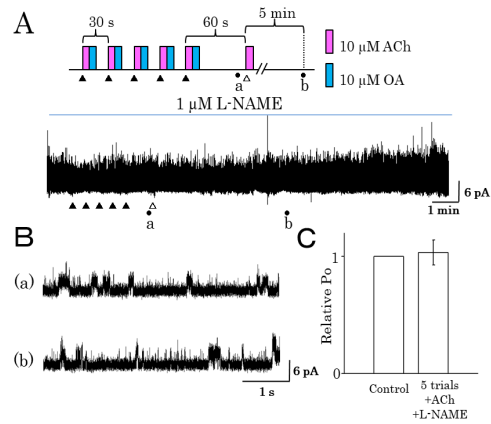


図 4 L-NAME 存在下における CS-US 対刺激後の Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率変化。A: 上段は、CS-US, CS 刺激の模式図。B,C: 5 回の条件付け後、ACh 投与 (CS) により Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率は変化しない

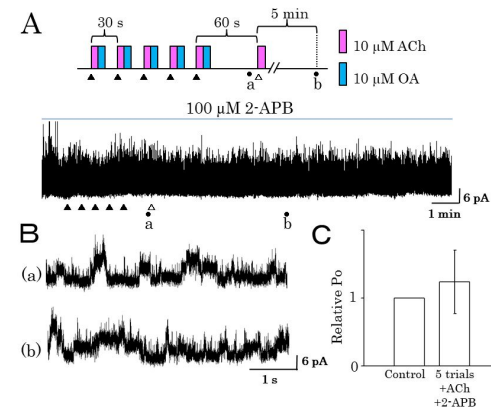


図 5 2-APB 存在下における CS-US 対刺激後の Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率変化。A: 上段は、CS-US, CS 刺激の模式図。B,C: 5 回の条件付け後、ACh 投与 (CS) により Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率は変化しない。

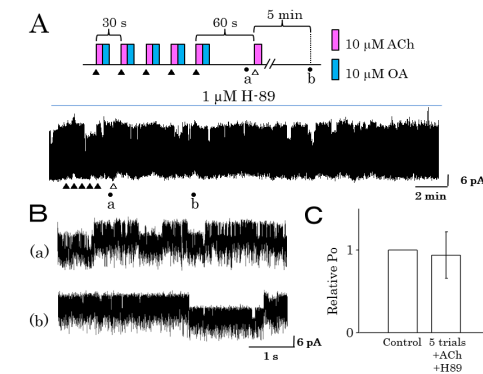


図 6 H-89 存在下における CS-US 対刺激後の Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率変化。A: 上段は、CS-US, CS 刺激の模式図。B,C: 5 回の条件付け後、ACh 投与 (CS) により Na⁺活性化 K⁺チャンネルの開口確率は変化しない。

以上の実験結果より、単一分離ニューロンに複数回の条件付け操作を施すと、単一カリウムチャンネルのAChに対する応答性が変化することが示された。そのメカニズムに、CS経路のACh/NO/cGMP/PKGシグナル伝達とUS経路のOA/cAMP/PKAシグナル伝達間のクロストークが関与している可能性が示唆された。これらの知見は、神経回路から分離された、単一ニューロンにおいても、学習・記憶を人為操作によって引き起こせる可能性を示唆しており、神経ネットワークの機能解明と同時に、これまで要素還元論として批判されてきた単一細胞の研究が重要な研究テーマになりえることを示唆している。

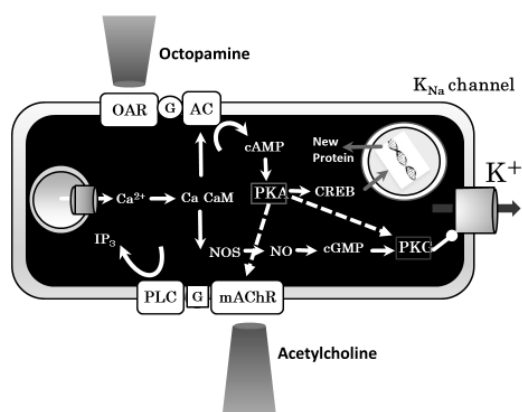


図7 CS経路のACh/NO/cGMP/PKGシグナル伝達とUS経路のOA/cAMP/PKAシグナル伝達間のクロストーク
 mAChR: muscarinic acetylcholine receptor, G: G protein, PLC: phospholipase C, OAR: octopamine receptor, IP₃: inositol triphosphate, AC: adenylyl cyclase, cAMP: cyclic AMP, PKA: protein kinase A, NO: nitric oxide, NOS: NO synthase, cGMP: cyclic GMP, K_{Na}: Na⁺ activated K⁺ channel, CREB: cyclic AMP response element binding protein

5. 主な発表論文等

(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 6 件)

Ikeda M, Yoshino M, Nitric oxide augments single persistent Na⁺ channel currents via the cGMP/PKG signaling pathway in Kenyon cells isolated from the cricket mushroom bodies, *Journal of Neurophysiology* (in press), 査読有、2018
 DOI:10.1152/jn.00440.2017

Hasebe M, Yoshino M, Nitric oxide/cGMP/PKG signaling pathway activated by M₁-type muscarinic acetylcholine receptor cascade inhibits Na⁺-activated K⁺ currents in Kenyon cells, *Journal of Neurophysiology*, 査読有, vol. 115, 2016, pp. 3174-3185
 DOI:10.1152/jn.00036.2015

Kumiko Kosakai, Yuuki Tsujuchi, Masami Yoshino, Nitric oxide augments single Ca²⁺ channel currents via cGMP-dependent protein kinase in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, vol. 78, 2015, pp. 26-32
 DOI:10.1016/j.jinsphys.2015.04.009

Hirotake Tamashiro, Masami Yoshino, Involvement of plasma membrane Ca²⁺ channels, IP₃ receptors, and ryanodine receptors in the generation of spontaneous rhythmic contractions of the cricket lateral oviduct, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 71, 2014, pp. 97-104
 DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.10.004

Hirotake Tamashiro, Masami Yoshino, Signaling pathway underlying the octopaminergic modulation of myogenic contraction in the cricket lateral oviduct, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 71, 2014, pp. 30-36
 DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.09.010

Shigeki Inoue, Kaoru Murata, Aiko Tanaka, Eri Kakuta, Saori Tanemura, Shiori Hatakeyama, Atunao Nakamura, Chihiro Yamamoto, Masaharu Hasebe, Kumiko Kosakai, Masami Yoshino, Ionic channel mechanisms mediating the intrinsic excitability of Kenyon cells in the mushroom body of the cricket brain, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 68, 2014, pp. 48-57
 DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.06.013

[学会発表](計 14 件)

高橋 泉, 吉野正巳, 単一ニューロンにおける連合学習, 第 94 回日本生理学会大会(浜松), 2017 年

池田真理子, 吉野正巳, ケニオン細胞における内因性・外因性 NO による持続性 Na 電流の調節, 第 94 回日本生理学会大会(浜松), 2017 年

吉野正巳, 昆虫脳ニューロンの膜興奮性とイオンチャンネル, 日本動物学会第68回関東支部大会シンポジウム(横浜), 2016 年

Yoshino M, Modulation of native ionic channels by nitric oxide and acetylcholine signaling pathways in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain, Symposium: Molecular Pharmacology and Physiology of Membrane Transport and Signaling Processes XXV International Congress of Entomology (Florida, USA), 2016

深津海斗, 吉野正巳, コオロギのケニオン細胞に発現する電位依存性 Na⁺チャネ

ルに対する一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会 (東京)、2015 年

古市達樹、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に見られる活動電位のイオン機構と一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会 (東京)、2015 年

石丸祐基、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する BK チャネルのムスカリン性受容体による制御、日本動物学会第 67 回関東支部大会 (東京)、2015 年

高橋 泉、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する巨大コンダクタンス Na^+ 活性化 K^+ チャネルと TTX 感受性持続性 Na^+ 電流の機能関連、日本動物学会第 67 回関東支部大会 (東京)、2015 年

小境久美子、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャネルの性質と一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会 (東京)、2015 年

高橋 泉、石丸祐基、中村敦直、田中藍子、吉野正巳、フタホシコオロギケニオン細胞に見いだされた電位依存性 Na^+ チャネルと Na^+ 活性化 K^+ チャネルの機能関連、日本動物学会第 85 回大会 (仙台)、2014 年

深津海斗、古市達樹、池田真理子、石丸祐基、吉野正巳、ケニオン細胞の Na^+ チャネルに対する一酸化窒素 (NO) の作用、日本動物学会第 85 回大会 (仙台)、2014 年

吉野正巳、昆虫の記憶中枢ニューロンに見いだされた持続性 Na^+ 電流の性質、日本生理学会第 91 回大会 (鹿児島)、2014 年

Yoshino M、Intrinsic membrane properties of acutely dissociated Kenyon cells and their modulation by nitric oxide signaling pathway、11th International Congress of Neuroethology、2014CN/JSCVPB、July 31、Sapporo Convention Center (Sapporo)、2014

Yoshino M、Intrinsic membrane properties of acutely dissociated Kenyon cells and their modulation by nitric oxide signaling pathway、HNW2014、Hokkaido Neuroethology Workshops、2014 Satellite to 2014 ICN/JSCPB、July 27、Hokkaido University Sapporo Campus (Sapporo)、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野 正巳 (YOSHINO, Masami)
東京学芸大学・教育学部・名誉教授
研究者番号: 20175681