

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19770059
 研究課題名 (和文) 軟体動物の行動変化に関わるセロトニン放出量調節機構に関わる研究
 研究課題名 (英文) The function of serotonin transporter for associative learning in the pond snail

研究代表者

定本 久世 (SADAMOTO HISAYO)
 徳島文理大学・香川薬学部・助教
 研究者番号：70374220

研究成果の概要：

行動変化に関わる神経機構において「伝達物質放出量調節に関わる細胞内分子機構」と「神経細胞の生理学的変化」、「行動変化」との関係性を直接的に明らかにすることを目的とした。軟体動物モノアラガイの味覚を用いた連合学習では、特定セロトニン分泌神経細胞が重要である。本研究ではセロトニン放出量調節に関わるセロトニントランスポーター (SERT) 分子に着目し、学習行動変化にともなうセロトニン細胞内の SERT 遺伝子発現変化、特定細胞間のシナプス強度減弱を観察した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理

キーワード：行動学、神経化学、脳・神経、分子生物学、神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

本研究で着目するセロトニントランスポーター (SERT) は、シナプス間隙のセロトニンを再取り込みして放出量を減少させる分子である。SERT 遺伝子上流域の多型と精神神経疾患との関連や、SERT 特異的阻害剤投与による行動変化の関連解析などから、SERT によるセロトニン放出量調節と行動との関係が報告されている。

また、SERT 遺伝子発現調節に関しては、転写調節因子 CREB (cAMP 応答性エレメント結合

タンパク質) および PKC 経路の関与が示されているが、両経路の関係は明らかではない。さらに、細胞種や発生段階によって SERT 遺伝子の発現調節機構が異なることが明らかになり、実験系を用いて個体内における実際の生物学的性質を探索する困難さが改めて浮き彫りにされた。また、哺乳類などの複雑な神経系を持つ実験動物ではセロトニン作用部位を特定した研究が難しい。このため、多くの研究が進められながら「行動」—「細胞」—「遺伝子」という生物学的階層性を通

した解析はなされていないかった。

2. 研究の目的

本研究では、行動変化に関わる神経機構において「伝達物質放出量調節に関わる細胞内分子機構」と「神経細胞の生理学的変化」、「行動変化」との関係性を直接的に明らかにすることを目的とした。このため、実験動物として軟体動物を利用した。

軟体動物は単純な神経系を持ち、行動に関連する神経回路について単一細胞レベルでの解析が進んでいる。特にモノアラガイでは、特定セロトニン分泌神経細胞からの伝達物質放出量変化が、味覚を用いた連合学習による行動変化につながる事が示唆されている。また、申請者らの先行研究により、同細胞内の遺伝子発現調節機構に関する以下の結果も得られていた。

(1) モノアラガイは、連合学習の一種である味覚嫌悪学習を習得し、そしゃく行動を変化させる。また、長期記憶として持続した行動変化をおこす。

(2) 味覚嫌悪学習ではセロトニン分泌神経細胞 Cerebral Giant Cell (CGC) が鍵となり、その標的細胞に対するシナプス伝達効率が学習後に変化する。

(3) CGC からのセロトニン放出量変化には、cAMP 経路、転写調節因子 CREB を介した遺伝子発現が関与する。

(4) 申請者らは既にモノアラガイ SERT 遺伝子の同定を終え、同遺伝子の発現調節に関わる遺伝子上流領域に複数の CREB 認識配列を確認していた。

本研究ではこれらの知見をもとに、セロトニン放出量に関わる細胞内分子機構の変化と、生理学的変化、行動学的変化との関係についてセロトニン分泌神経細胞 CGC に着目しながら研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系における SERT 遺伝子発現解析

モノアラガイ中枢神経系における SERT 発現様式を観察するため、in situ ハイブリダイゼーション法による組織内 SERT mRNA 分布の可視化を行った。また、リアルタイム PCR 法を用いて神経節あたりの SERT mRNA 量を定量解析した。

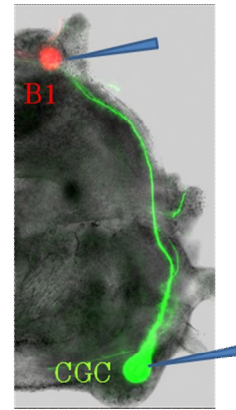
(2) SERT 遺伝子上流領域を用いた転写活性測定

モノアラガイ SERT 遺伝子発現に関わる転写調節メカニズムを解析するにあたり、培養細胞系 (F9) とルシフェラーゼベクターを用いた転写活性測定を行った。3種類の異なる長さのモノアラガイ SERT 遺伝子上流領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、PKA 活性化剤フォルスコリンを投与して転写活性を測定した。フォルスコリンは PKA 経路を介して転写調節因子 CREB の活性化を促すことが知られている。

(3) SERT 阻害剤による薬理学実験

モノアラガイ中枢神経系を単離し、生理学実験により SERT 阻害剤効果を検討した。実験には、味覚嫌悪学習で重要な働きを持つ特定セロトニン分泌神経細胞 (CGC) と、CGC から直接入力を受ける唾液腺運動神経細胞 (B1) を用いた。CGC に対して一定の電気刺激を与え、B1 細胞の応答を解析した。

また、SERT 選択的阻害剤として、哺乳類で用いられるフルボキサミン、シタロプラムとともに、ドーパミントランスポーター阻害剤マジンドルを使用した。(研究協力者：小林 卓)

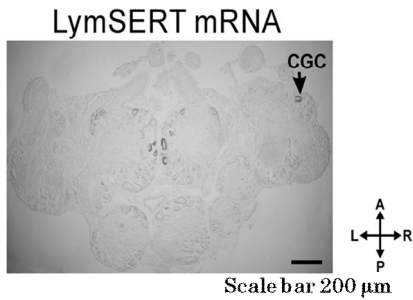


(4) 学習に関わる CGC からのセロトニン放出量解析

連合学習の一種である味覚嫌悪学習を施した個体、またコントロールとして無刺激の個体から中枢神経系を単離し、学習後 30 分における CGC-B1 間のシナプス伝達効率を解析した。(研究協力者：濱 德行)

4. 研究成果

(1) 中枢神経系における SERT 遺伝子発現
モノアラガイ中枢神経系において SERT 遺伝子発現様式を観察した結果、セロトニン含有神経細胞における SERT 遺伝子発現を確認した。また、CGC を含む神経節においては、CGC のみが主に SERT 遺伝子を発現していることを確認した。(論文④)



(2) 学習に関わる CGC からのセロトニン放出量解析

学習による中枢神経系内 SERT 遺伝子発現変化

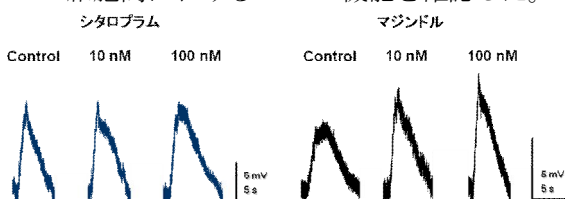
味覚嫌悪学習のトレーニングを施した個体群（学習群）とコントロール群から味覚嫌悪学習で重要なセロトニン細胞 CGC を含む神経節を採集し、SERT 遺伝子発現量の定量解析を行った。その結果、学習 30 分後において、学習群の SERT 遺伝子発現量は、コントロール群に比べて有意に上昇していることが示された。

(3) SERT 遺伝子転写活性測定

モノアラガイ SERT 遺伝子上流領域には複数の転写調節因子 CREB の標的配列が存在する。CREB による転写調節機構は動物種を通して保存されているため、哺乳類培養細胞系を解析に使用した。その結果、PKA 活性化剤フォルスコリン投与後にモノアラガイ SERT 遺伝子上流領域 (1,700 塩基) による転写活性が上昇した。同結果から、モノアラガイ SERT 遺伝子発現には cAMP 経路を介した CREB による転写活性機構が働くことが示された。

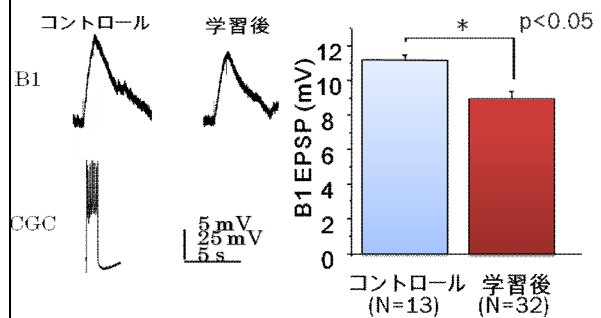
(4) SERT 阻害剤による薬理学実験

本実験では、特定セロトニン分泌神経細胞 (CGC) と、CGC から直接入力を受ける唾液腺運動細胞 (B1) 間のシナプス伝達において SERT 阻害剤の薬理効果を検討した。その結果、哺乳類で使用される SERT 阻害剤 (フルボキサミン、シタロプラム) は効果を示さず、ドーパミントランスポーター阻害剤 (マジンドル) はシナプス伝達効率を増強し、強い SERT 阻害効果を示した。申請者が同定した遺伝子配列から、モノアラガイ SERT アミノ酸配列では SERT 阻害剤作用に関わる部位が哺乳類などと異なって、ドーパミン阻害剤反応性配列になっていることが分かっていた。このため、この結果は配列解析と一致しており、CGC-B1 細胞間における SERT の機能を確認した。



(5) 学習によるセロトニン分泌神経細胞の生理応答変化

味覚嫌悪学習トレーニングを施した個体群（学習群）とコントロール群（非学習群）から中枢神経系を摘出し、CGC-B1 細胞間のシナプス伝達効率を解析した。その結果、学習後には CGC-唾液腺運動神経細胞 B1 間のシナプス伝達効率が減弱することがわかった。また、この結果は、味覚嫌悪学習によるそしゃく行動・唾液分泌の減少という行動レベルの変化とも一致することが示された。



以上の結果より、味覚を用いた連合学習は転写調節因子 CREB を介してセロトニン分泌神経細胞内の SERT 遺伝子発現を促進することが示された。特に、学習行動による唾液腺活動低下 (行動レベル)、セロトニン分泌細胞から唾液腺運動神経細胞に対するシナプス入力への減弱 (細胞レベル)、同細胞における SERT 遺伝子発現上昇 (遺伝子レベル) という変化が一致することを確認した。本研究により行動-細胞-遺伝子という生物学的階層性を通じた解析を進め、SERT 遺伝子発現量と生理応答変化および学習行動変化との関係を示した。

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 4 件)

- ① 高嶋聰、定本久世、奥田明子、伊藤悦朗、Atomic Force Microscopic Observation of Nucleosomes Consisting of Core Histones and DNA Promoter Regions. Information, Vol. 11、513-523、平成 20 年 (2008)、査読有
- ② 定本久世、リアルタイム PCR システムを用いた微量 mRNA 定量法、比較生理化学、Vol. 24、17-18、平成 19 年 (2007)、査読無
- ③ 須貝理央、浅見幸代、志賀葉月、渡辺隆之、定本久世、小林卓、畠山大、藤戸裕、

ケン・ルコイヤック、伊藤悦朗、One-trial conditioned taste aversion in *Lymnaea*: good and poor performers in long-term memory acquisition. Journal Experimental Biology、Vol. 210、1225-1237、平成 19 年 (2007)、査読有

- ④ 定本久世、セルフォゾ・ゾルタン、伊藤悦朗、Localization of Serotonin Transporter mRNA in the CNS of *Lymnaea stagnalis*. Acta Biologica Hungarica、Vol. 59、61-64、平成 19 年 (2007)、査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 定本久世、伊藤悦朗、軟体動物の味覚嫌悪学習に関連するセロトニン分泌量調節、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、平成 20 年 (2008) 12 月 10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ② 定本久世、小林卓、伊藤悦朗、軟体動物の味覚学習にかかわるセロトニン分泌量調節機構 Regulatory mechanism controlling serotonergic neurotransmission in learning snails、日本生物物理学会第 46 回年会、平成 20 年 (2008) 12 月 4 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ③ 定本久世、小林卓、濱德行、伊藤悦朗、味覚嫌悪学習にかかわる神経細胞 CGC からの伝達物質放出量変化、平成 20 年度無脊椎動物神経生物研究会、平成 20 年 (2008) 9 月 16 日、旭川大雪地ビール館デザインギャラリー (北海道旭川市)
- ④ 定本久世、伊藤悦朗、軟体動物の学習に関与する伝達物質量調節機構、日本動物学会第 79 回福岡大会、平成 20 年 (2008) 9 月 6 日、福岡大学七隈キャンパス (福岡県福岡市)
- ⑤ 定本久世、伊藤悦朗、モノアラガイ学習系に関わるセロトニントランスポーター発現調節機構、日本比較生理生化学会第 30 回大会、平成 20 年 (2008) 7 月 20 日、北海道大学理学部 (北海道札幌市)
- ⑥ 定本久世、伊藤悦朗、モノアラガイ味覚嫌悪学習における神経伝達物質セロトニンを含む分子調節機構、日本生物物理学会第 1 回中国四国支部大会、平成 20 年 (2008) 5 月 10 日、高知大学朝倉キャンパス (高知県高知市)
- ⑦ 定本久世、一細胞レベルにおける学習・記憶形成に関わる分子機構解析、日本生物物理学会第 45 回年会、平成 19 年 (2007) 12 月 22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑧ 定本久世、伊藤悦朗、The gene expression of serotonin transporter in the CNS of *Lymnaea stagnalis*、Society for Neuroscience 2007、平成 19 年 (2007) 11 月 5 日、San Diego Convention Center (San

Diego CA, USA)

- ⑨ 定本久世、伊藤悦朗、ヨーロッパモノアラガイの味覚学習に関わるセロトニントランスポーター遺伝子発現、日本動物学会第 78 回大会、平成 19 年 (2007) 9 月 20 日、弘前大学 (青森県弘前市)
- ⑩ 定本久世、セルフォゾ・ゾルタン、伊藤悦朗、The gene expression of serotonin transporter related to the conditioned taste aversion learning in the CNS of *Lymnaea stagnalis*. 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology、平成 19 年 (2007) 8 月 28 日、Balaton Limnological Research Institute (Tihany, Hungary)
- ⑪ 定本久世、伊藤悦朗、モノアラガイ味覚学習に関わるセロトニントランスポーター遺伝子発現、日本比較生理生化学会第 29 回大会、平成 19 年 (2007) 7 月 6 日、岡山大学創立 50 周年記念館 (岡山県岡山市)
- ⑫ 定本久世、伊藤悦朗、Changes of CREB mRNA in *Lymnaea stagnalis* after learning. Gastropod Neuroscience: Past Success, Future Prospects、平成 19 年 (2007) 6 月 7 日、Friday Harbor Laboratories (Friday Harbor WA, USA)

[図書] (計 1 件)

身近な動物を使った実験 2、鈴木範男編、伊藤悦朗、金沢昭良、北村美一郎、小林一也、小林卓、定本久世、松尾亮太、松本緑、箕田康一共著、三共出版

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph07/index.htm>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定本 久世 (SADAMOTO HISAYO)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号：70374220

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

小林 卓 (KOBAYASHI SUGURU)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
濱 德行 (HAMA NORIYUKI)
島根大学・医学部・助教
藤戸 裕 (FUJITO YUTAKA)
札幌医科大学・医学部・準教授

村上 準 (MURKAMI JYUN)
徳島文理大学・香川薬学部・博士研究員