

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770058
 研究課題名 (和文) 産卵時における摂食神経回路網の可塑的变化
 研究課題名 (英文) Activity changes of feeding related neurons induced by egg-laying hormone

研究代表者

成末 憲治 (NARUSUYE KENJI)
 東邦大学・薬学部・講師
 研究者番号：30432850

研究成果の概要 (和文)：本研究は、産卵時における摂食行動の抑制に関わる摂食神経回路網を解明することを主な目的とした。軟体動物アメフラシ中枢に存在する同定ニューロンに対して産卵ホルモンの効果を検討した。産卵ホルモンは閉口運動ニューロンの活動頻度を増加させた。また、摂食様運動パターンで閉口開始時期を早くさせることが明らかになった。このことより口の運動パターンが食物を吐き出す方向へシフトすることで産卵時の動物個体に見られる摂食量の減少に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 investigated the effects of ELH (egg-laying hormone) on the activities of identified central neurons of *Aplysia kurodai*. Application of ELH induced increase of spike frequency and phase advance of the firing onset in JC (jaw-closing motor neuron), may contribute to decrease of the food intake during the reproductive periods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：アメフラシ、軟体動物、摂食行動、産卵ホルモン、神経回路、可塑性、神経生物

1. 研究開始当初の背景

軟体動物アメフラシ (*Aplysia*) の摂食行動に関わる神経回路網は、アメリカの Kupfermann や Weissらのグループによりニューロンが同定され解明されている。アメフラシの摂食行動に関与する神経節は脳神経節と口球神経節である。口唇部や触角部などの頭部組織は主

に脳神経節が支配しており、口や歯舌を動かす筋組織である口球や咽頭、食道などは主に口球神経節が支配している。日本に生息するアメフラシの摂食行動については長濱らのグループにより研究が行われ、口の運動パターン形成に重要な働きを担う脳神経節・口球神経節内ニューロンが複数同定されている。

また、アメフラシの食物嗜好性に着目して、好きな海藻であるアオサにより誘発される摂食応答と嫌いな海藻であるマクサにより誘発される吐き出し応答のスイッチ機構の研究も進んでいる。

アメフラシのライフサイクルは一年で、産卵行動は5～8月にかけて起こる。産卵行動に関与する神経節は腹部神経節であり、その支配領域は呼吸器系、内臓系、生殖器系と幅が広い。産卵は、腹部神経節の前方にある神経分泌細胞 (Bag cells) から産卵ホルモン (Egg-laying hormone, ELH) が分泌されることで引き起こされる。ELH は36個のアミノ酸からなる。両性腺 (hermaphroditic gland) の濾胞周囲に存在する筋細胞に作用して排卵させる。また、神経系にも働いて摂食活動を停止させ、産卵行動を誘発させる。ELH mRNA の発現量は性成熟前よりも性成熟後で25倍多く発現していることが報告されており、ELH が産卵時における摂食量の減少に影響を与えていることが考えられる。

2. 研究の目的

本能行動は動物が生まれながらにしてもっている適応の仕組みである。中でも摂食行動や産卵行動は、動物の脳内に存在するペプチドホルモンや神経伝達物質により制御されている。

摂食行動は動物の生命を維持していく上で必須のものであり、動物の成長に大きな影響を与える。哺乳動物では脳内摂食調節ペプチドが数多く見つかっており、摂食量が増える作用のあるニューロペプチドY、オレキシン、グレリン、成長ホルモン放出ホルモンなどがあり、また摂食量が減る作用のあるレプチン、ガストリンなどが知られている。

産卵行動は動物が自己と同じ種類の個体を生産して、種を維持するために重要である。魚類では視床下部から生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) が分泌されて、脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン (Gonadotropic hormone, GTH) の働きを高めて性成熟を促進する。その後、バソトシンにより産卵行動が誘発されることが示唆されている。

このように摂食行動と産卵行動のそれぞれについて研究が行われ、その制御機構が解明されている。しかし、摂食行動と産卵行動は同時に起こることはなく、どちらか一方の行動が選択され、他の一方が抑制されることが知られている。そこで本研究では摂食行動と産卵行動のスイッチに関わる神経機構の解明を目的とした。特に、産卵時における摂食行動の抑制に関わる摂食神経回路網の可塑的变化に着目して研究を行った。実験動物として、摂食行動と産卵行動のそれぞれについて神経回路網が解明されている軟体動物ア

メフラシを用いた。

3. 研究の方法

実験方法としてカルシウムイメージング法を用いた光学的解析と細胞内記録法を用いた電気生理学的解析を行った

(1) アメフラシは海藻が口唇・触角部に触れると味を感じて摂食する。口唇・触角部からの情報は ULAB (Upper labial) 神経、AT (Anterior tentacular) 神経、LLAB (Lower labial) 神経の3対の神経を介して脳神経節に伝えられる。そこで末梢から中枢へ至る神経応答変化を解析するために、アメフラシの単離脳一触角標本を用いて脳神経節へ至る3対の神経束の活動を吸引電極で細胞外記録をとり、自発的神経応答に対するELHの効果調べた。

また、脳神経節の前部にあるGクラスターは摂食に関わるニューロンが多数存在する。脳神経節Gクラスターに存在する複数ニューロンの味情報 (海藻抽出液) に対する応答をカルシウムイメージング法で測定して、摂食応答を調べた。なお、カルシウム感受性色素として、Calcium Green-1を用いた。

(2) アメフラシの口球神経節は、口や顎のリズミカルな運動パターン形成に関与している。摂食応答時、CPG (Central pattern generator) 構成ニューロンである MA (Multi-action)、開口運動ニューロン JO (Jaw-opening) と閉口運動ニューロン JC (Jaw-closing) にパターン活動が誘発される。これら同定ニューロンに対するELHの効果はアメフラシの単離脳神経節一口球神経節一口球筋標本を用いて調べた。また、摂食様運動パターンは食道神経を電気頻回刺激することで誘発することもできる。この擬似摂食パターンがELHにより変化するかどうかをニューロンにガラス微小電極を刺入して細胞内記録法により調べた。

(3) 産卵時にアメフラシの摂食量が減少することが知られており、この理由の一つとして摂食運動機能の低下が起こることが予想される。そこで開口運動ニューロン JO を用いて、産卵期前後における口や顎運動の変化について調べた。JOを細胞内通電したときの筋運動を測定するため、等張性張力計を用いた。

4. 研究成果

本研究では、産卵時における摂食行動の抑制に関わる摂食神経回路網とその細胞内メカニズムを解明するために、アメフラシの摂食中枢である脳神経節と口球神経節に存在するニューロンに対して産卵ホルモンであるELHの効果調べた。ELHがアメフラシ中枢のうち、(1)味覚、(2)中枢、(3)運動のどこを修飾しているかについて検討した。

(1) ELHによる味覚修飾の可能性

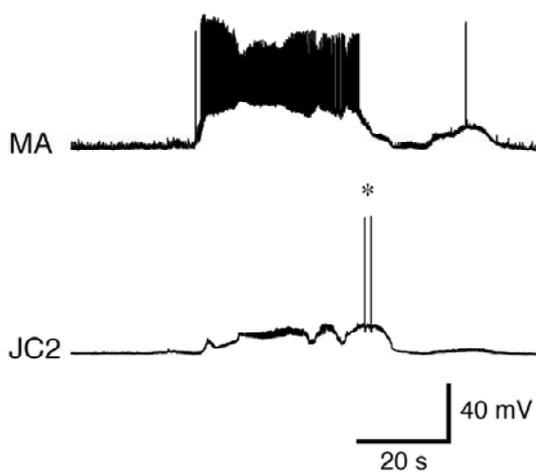
ULAB、AT、LLABの3対の神経束の自発的応答に対するELHの効果調べたところ、ELH添加前後で有意な差は見られなかった。味覚入力経路に対するELHの効果さらに検討するため、海藻抽出液を動物の口唇部へ与えたときの神経応答変化を調べる予定である。

アメフラシ脳神経節Gクラスターにある複数のニューロンの味覚応答を調べたところ、アオサ抽出液に対して強く反応するニューロン群が見つかった。これらニューロンに対するELHの効果今後検討していく。

(2) ELHによる中枢修飾の可能性

アメフラシの口球神経節に存在する同定ニューロンMA、JO、JCに対して産卵ホルモンであるELHの効果を検討した。ELHの添加前後でMA、JO、JCの静止膜電位に変化は見られなかった。次に、MA、JO、JCの自発的応答に対するELHの効果調べたところ、MAの自発的放電期間が比較的短い場合はJO、JCに変化は見られなかったが、MAの放電期間が長い場合はJCに誘発されるスパイク数がELH添加後に増えることがわかった(図1、2A)。

A Control



B ELH (60 min)

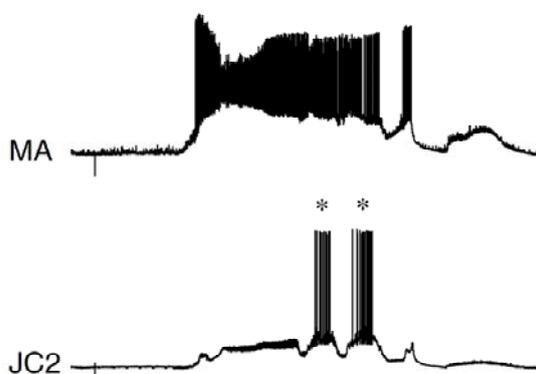
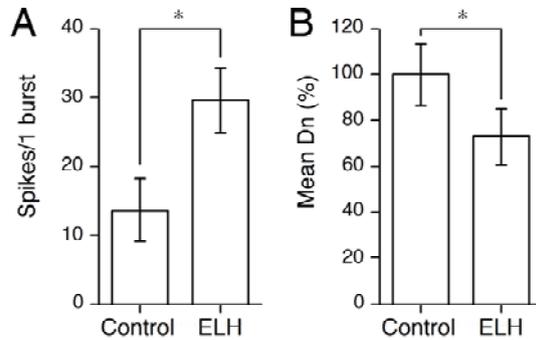


図1 自発的発火応答に対するELHの効果。A. コントロール。B. ELH添加60分後。

JCの発火時期の位相関係を詳しく調べるためにDn値(Normalized delay)を定義して解析を行った。Dn値は、JCの脱分極時間に対する発火開始の遅れの割合を正規化したものである。JCの自発的応答に対するELHの効果調べたところ、ELH添加後にJCのDn値がコントロールに比べて有意に減少した(図2B)。

図2 閉口運動ニューロンJCの自発スパイク



数(A)とDn値(B)に対するELHの効果。

次に、食道神経を電氣的に頻回刺激して中枢神経回路に摂食様運動パターンを誘発させたときのELHの効果調べた。擬似摂食応答時、ELHの添加前後でMA、JOに誘発されたスパイク数にほとんど変化は見られなかったが、JCのスパイク数はELH添加後に有意に増加した。スパイク数の増加はELH添加15分後から2時間後まで見られ、洗浄1時間後でも増加が持続した(図3A)。また、JCのDn値は、ELH添加15分後から2時間後まで有意に減少して、洗浄1時間後でも減少が持続した(図3B)。

さらに、JO、JCの発火活性に対するELHの効果調べたところ、JOはELH添加後に同一通電量に対して誘発されるスパイク数が減少したのに対して、JCは逆に増加する傾向が見られた。すなわち、JOの電流発火活性は下がり、JCの発火活性は上がった。

以上の結果、ELHにより中枢神経回路が修飾され、摂食応答時のJCのスパイク数が有意に増加することが明らかになった。これは開口に比べて閉口時間の増加を意味している。また、Dn値の減少は、摂食様運動パターンにおいてJCの発火開始時期が早くなることを意味している。この運動パターンの変化は、過去の研究より明らかになった吐き出し様運動パターンに類似している。すなわち、ELHによりJCの運動パターンが修飾され、閉口時期が早くなることで運動パターンが食物を吐き出す方向へシフトする。これらのことより、ELHは産卵時の動物個体に見られる摂食量の減少に関与している可能性が示唆された。なお、ELHにより引き起こされる行動変化がどのような細胞内情報伝達系を用いているかについては、今後も検討を続ける。

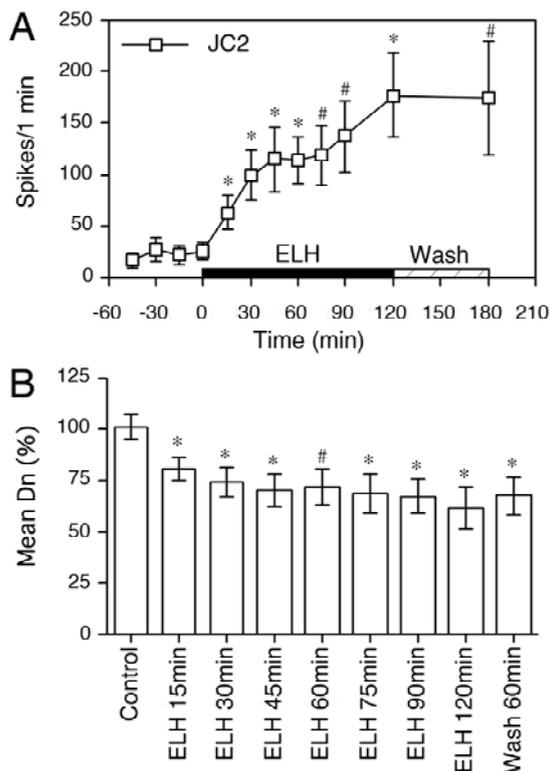


図3 食道神経を電気頻回刺激したときに誘発される摂食様運動パターンにおける開口運動ニューロン JC のスパイク数(A)と Dn 値(B)に対する ELH の経時効果。

(3) ELH による運動修飾の可能性

J0を細胞内通電したときに誘発される開口筋運動は産卵期前の個体に比べて産卵期の個体の方が減衰した。J0の発火頻度が同じ場合でも両個体間で開口筋運動能に明らかな差が見られた。しかし、J0の細胞内通電による活動電位発生に関わる興奮能は、両個体間で差が見られなかったことから、ニューロン自体は正常に応答することがわかった。このことから開口筋運動能の減衰は、ニューロンと口球筋間の情報伝達に障害が生じている可能性が示唆された。今後、開口筋運動能に対するELHの効果を検討する。

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) Nagahama, T., Fujimoto, K., Takami, S., Kinugawa, A., and Narusuye, K. Effective amino acid composition of seaweeds inducing food preference behaviors in *Aplysia kurodai*. *Neuroscience Research* 査読有 64 (3): 243-250, 2009.

(2) Narusuye, K., Nagahama, T. Effects of egg laying hormone on identified feeding

neural elements of buccal ganglion in *Aplysia kurodai*. *Journal of Physiological Sciences* 査読無 59 Suppl.1: 482-482, 2009.

(3) Nagahama, T., Fujimoto, K., Takami, S., Kinugawa, A., and Narusuye, K. Search for amino acid components of seaweeds inducing *Aplysia* food preference. *Neuroscience Research* 査読無 65 Suppl.1: S210-S210, 2009.

(4) Narusuye, K., Nagahama, T. Effects of egg laying hormone on *Aplysia* feeding neural circuits. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 査読無 151: 450-450, 2008.

[学会発表] (計4件)

(1) 長濱辰文、アメフラシの食物嗜好性行動を誘発する海藻アミノ酸成分の探索、第32回日本神経科学大会 P3-c17、名古屋国際会議場、Sep. 18, 2009

(2) 成末憲治、Effects of egg laying hormone on identified feeding neural elements of buccal ganglion in *Aplysia kurodai*、第36回国際生理学会世界大会 (IUPS2009) P4PM-13-35、京都国際会館、Jul. 31, 2009

(3) 鹿島惇紘、老化に伴うアメフラシ開口筋運動能の減衰とそのメカニズムの解明、日本薬学会第129年会 27Q-am170、京都国際会館、Mar. 27, 2009

(4) 成末憲治、アメフラシ摂食神経回路網に対する産卵ホルモンの効果、第30回日本比較生理生化学会 25 (10)、北海道大学、Jul. 21, 2008

[その他]

(1) ホームページ等

東邦大学教育・研究業績データベース

http://www.toho-u.ac.jp/kenkyu_db/index.html

(2) 平成21年度 ひらめき☆ときめきサイエンスーようこそ大学の研究室へ~KAKENHI、HT21072、「くすりの効きかた、造りかた」、(代表：成末憲治、分担：10名、小中高生166名対象)、東邦大学薬学部、Aug. 21, 2009

(3) 平成20年度 東邦大学夏休み薬学教室、「単純な脳のしくみを見てみよう」、(代表：森下宗夫、分担：成末憲治、他9名、中高生156名対象)、東邦大学薬学部、Aug. 1, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成末 憲治 (NARUSUYE KENJI)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：30432850

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし