

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570074

研究課題名（和文） 昆虫における嗅覚連合学習の分子機構の解明

研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms underlying the insect olfactory associative learning

研究代表者

吉野 正巳（YOSHINO MASAMI）

東京学芸大学・教育学部・教授

研究者番号：20175681

研究成果の概要（和文）：昆虫の嗅覚連合学習における条件刺激（匂い情報）を媒介するアセチルコリン（ACh）の下流に位置するシグナル伝達経路を、ケニオン細胞に同定されたイオンチャネル（Na<sup>+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネル及び電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル）の活動を指標に調査した。その結果、ACh は M<sub>1</sub> ムスカリン性 ACh 受容体を活性化し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>放出、それに続く Ca<sup>2+</sup>・カルモジュリン複合体の活性化そして NOS の活性化を引き起こし NO 産生を誘導することが明らかにされた。M<sub>1</sub> 受容体活性化により駆動される NO シグナルカスケードは Na<sup>+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネルを抑制し、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを活性化することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular basis of CS-US association, first I investigated the receptors and ionic channels expressed in Kenyon cells and second their regulation by neurotransmitter substances which convey US and CS signals. The present study mainly focused on the modulation of Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> and voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels induced by muscarinic receptor activation and its possible downstream pathway involving NOS/NO/cGMP/PKG signaling. The present results indicate that muscarinic type of M<sub>1</sub> receptor activation decreases the open probability (NPo) of K<sub>Na</sub> channels and increases NPo of Ca<sup>2+</sup> channels via the sequential activation of PLC, Ca/CAM complex and NOS/NO/cGMP/PKG signaling cascades in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket *Gryllus bimaculatus*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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：昆虫・連合学習。キノコ体・ケニオン細胞・イオンチャネル・受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、昆虫が高い連合学習能力を持つことを示す実験事実が報告されている。フタホシ

コオロギを用いた嗅覚学習訓練と行動薬理学実験により報酬学習にオクトパミン作動性ニューロンが、罰学習にドーパミン作動性ニ

ニューロンが関与することが報告された (Matsumoto & Mizunami(2004), Unoki et al.(2005), Matsumoto et al.(2006)。

一方、条件刺激と無条件刺激が連合する部位は昆虫の前大脳部位にあるキノコ体の内在ニューロン、ケニオン細胞であることが、ショウジョウバエ、ミツバチ、コオロギで示唆されている。しかしながら、コオロギで明らかにされた古典的条件づけというマクロな行動レベルの現象の神経細胞・分子レベルでのメカニズムは不明のままである。ベルリン自由大学のメンゼル教授グループはこの分野で先導的役割を果たし、行動学、組織学、電気生理学、イメージングなど多様な手法を用いて昆虫の記憶・学習の性質、メカニズムを追及している。しかし、イオンチャネルや受容体の修飾機構については必ずしも成功していない。その原因はパッチクランプ法の適用に際し、いわゆるコンベンショナルホールセルの手法で行う点にあると思われる。すなわちこの手法では、細胞内の重要な調節因子が皆流出してしまう。

そこで私は、このような細胞内の調節因子の流出が起きない、Cell-attached patch clamp法と $\beta$ エステチンを用いた穿孔パッチクランプ法の適用が最適であると考え、報酬系伝達物質オクトパミン、罰系伝達物質ドーパミン、そして条件刺激の媒介伝達物質であるアセチルコリン(ACh)の同定イオンチャネルに対する変調修飾作用を明らかにしようと考えた。

## 2. 研究の目的

昆虫の持つ高度な嗅覚連合学習能力の生理機構を、イオンチャネルや受容体レベルで明らかにするため、短期、中期、長期記憶学習能力を持つフタホシコオロギに着目し、記憶中枢であるキノコ体のケニオン細胞にパ

ッチクランプ法を適用し、学習記憶機構の分子レベルでの機構解明を目的とした。すでに、ケニオン細胞膜上に細胞内 $\text{Na}^+$ 活性化 $\text{K}^+$ チャネル、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを同定し報酬系伝達物質のオクトパミンと罰系伝達物質のドーパミンの作用を明らかにしている (Journal of Neurophysiology, 2008 ; Journal of Neurophysiology, 2008))。

そこで次に条件刺激を媒介する神経伝達物質のアセチルコリンの同定チャネル及び誘発性、自発性活動電位に対する作用を調査し、アセチルコリン受容体の下流域に一酸化窒素シグナル伝達系の関与があるかを明らかにする。そして報酬情報と嫌悪情報を媒介するオクトパミン及びドーパミンの細胞内シグナルカスケードを重ね合わせ、条件刺激と無条件刺激の連合の基礎となる、クロストークを明らかにする。これによって昆虫の嗅覚連合学習の分子実体に迫ることができると考える。

## 3. 研究の方法

(1)ACh受容体サブタイプの同定: $\text{Na}^+$ 活性化 $\text{K}^+$ チャネル、 $\text{Ca}^{2+}$ 活性化 $\text{K}^+$ チャネル、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの単一チャネル電流をパッチクランプ法により導出し、AChの作用を明らかにする。次にムスカリン性ACh受容体阻害剤(アトロピン、ピレンゼピン、4-DAMP)及びニコチン性ACh受容体阻害剤( $\alpha$ ブンガロトキシン、メカミラミン、ヘキサメソウム)の効果を調べACh受容体サブタイプを特定する。

(2)ACh受容体下流のシグナル伝達経路を以下の順番に従い調査する。

ACh受容体 $\rightarrow$ フォスホリパーゼC(PLC) $\rightarrow$ 細胞内ストア $\text{Ca}^{2+}$ 放出 $\rightarrow\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 複合体によるNOSの活性化 $\rightarrow\text{NO}$ 産生 $\rightarrow$ 可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化 $\rightarrow\text{cGMP}$ の産生 $\rightarrow\text{PKG}$ の活性化 $\rightarrow$ イオンチャネルの

リン酸化

このため、各イオンチャネル電流の ACh 作用に対する PLC 阻害剤 U73122、IP<sub>3</sub> 受容体阻害剤ゼストスポンジン及び 2-APB、カルモジュリン阻害剤 W7 及び W5、ACh 作用に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤 L-NAME の作用を調べる。次に各イオンチャネル電流に対する NO 供与剤 GSNO 及び SNAP、NO 作用に対する可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害剤 ODQ、膜透過型 cGMP である 8-Brom cGMP、NO 作用に対する cGMP 依存性プロテインカイネース (PKG) 抑制剤 KT5823 の作用を調べる。

#### 4. 研究成果

(1)ケニオン細胞にCell-attached パッチクランプ法を適用し、同定イオンチャネルに対するアセチルコリン(ACh)の作用を調べ、以下の結果を得た。

①Na<sup>+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>Na</sub>チャネル)の開口確率 (Po) はAChにより減少した(図1)。

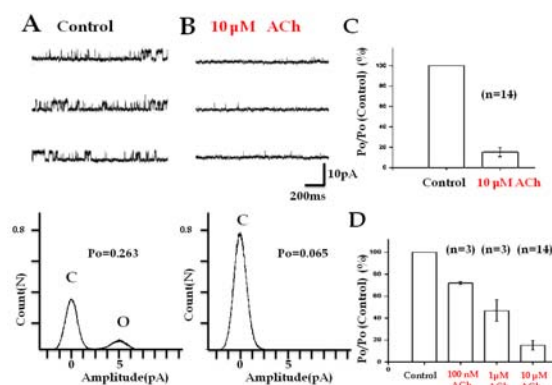


図1 K<sub>Na</sub>チャネル電流に対するAChの作用

②Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>Ca</sub>チャネル)の開口確率 (Po) はAChにより増大した。

③電位依存性L型Ca<sup>2+</sup>チャネルのPoはAChにより増加した。

④AChの作用は、ムスカリン性ACh受容体アンタゴニストのアトロピン、ピレンゼピンにより抑制された。

以上の結果は、匂い情報を媒介する神経伝達物質AChはムスカリン性ACh受容体を介しNa<sup>+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネルを抑制、Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネルと電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを活性化することを明らかにした。この知見はAChがニコチン性ACh受容体を介する早いシナプス伝達以外に、ムスカリン性ACh受容体介した遅い興奮作用を併せ持つことを示しており、嗅覚学習の機構への積極的関与、あるいは、脊椎動物の海馬で知られる、ムスカリン受容体を介した長期増強の亢進と類似の作用が存在する可能性を示唆するものである

(2)ケニオン細胞にCell-attached パッチクランプ法を適用し、NOドナーのSNAP及びGSNOの同定チャネルに対する作用を調べ、以下の結果を得た。

①Na<sup>+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>Na</sub>チャネル)のPoはNOドナーのGSNO及びSNAPにより減少した(図2)。

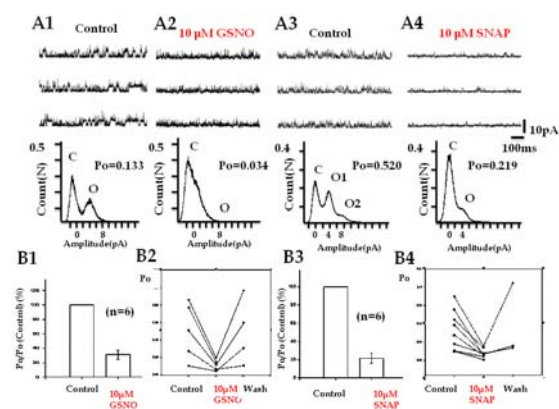


図2 K<sub>Na</sub>チャネル電流に対するGSNO及びSNAPの作用

②Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>Ca</sub>チャネル)のPoはNOドナーのGSNO及びSNAPにより増大した。

③Ca<sup>2+</sup>チャネルのPoはNOドナーのGSNO及びSNAPにより増加した(図3)。

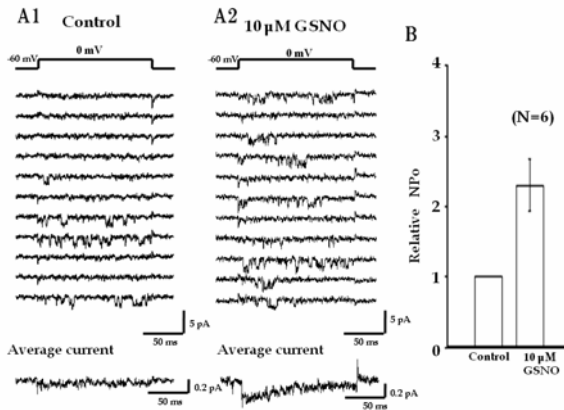


図3 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流に対するGSNOの作用

(3) ケニオン細胞にβエスチンを用いた穿孔パッチクランプ法を適用し、活動電位 (AP) を導出しその基本性質を調べた。またACh、NOの作用を調査し以下の知見を得た。

①誘発性及び自発性活動電位の発火頻度はACh (図4) 及びGSNOにより増加した。

②APの振幅はAChにより増大した(図4)。

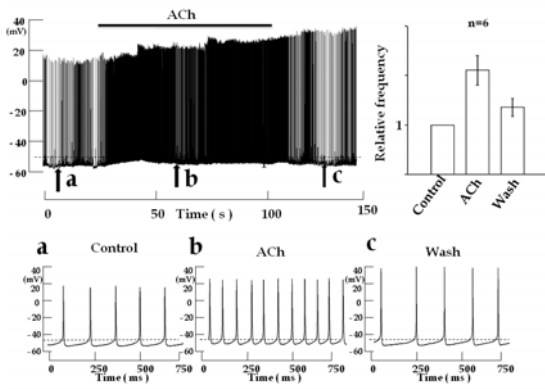


図4 ケニオン細胞の自発性活動電位に対するAChの作用

(4)ACh 受容体下流のシグナル伝達経路を各種シグナル伝達特異的ブロッカーを用いて調査し以下の結果を得た。

①PLC抑制剤のU73122はAChの作用を抑制した。

②カルモジュリン阻害剤W7はAChの作用を

抑制した。

③NOS抑制剤L-NAMEはAChの作用を抑制した。

④膜浸透性のcGMPはAChと類似の作用を示した。

⑤可溶性グアニル酸シクラーゼ抑制剤ODQはGSNOの作用を抑制した。

⑥PKG抑制剤KT5823はGSNOの作用を抑制した。

以上の結果から、ムスカリン性 ACh 受容体の下流に NO シグナル伝達系が存在し、cGMP/PKG を介して、K<sub>Na</sub> 電流は抑制、K<sub>Ca</sub> 電流と Ca<sup>2+</sup>チャネル電流は増強されることが判明した(図 5)。

以上の知見を総合すると、連合学習の成立過程においては、Na<sup>+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>チャネル、Na<sup>+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネルが、条件刺激及び無条件刺激により駆動される各シグナル伝達経路間クロストークにより調節を受け、ケニオン細胞の膜興奮性の恒常的変容が起こることが不可欠である可能性が示唆される。

Na<sup>+</sup>活性化 K<sup>+</sup>電流の抑制は膜の脱分極を持続させ、Ca<sup>2+</sup>電流の増加は Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>電流を増強し、活動電位再分極下降相を加速して活動電位発火頻度の上昇を導く。このことから、複数回の条件付けは、ニコチン性 ACh 受容体の活性化に加え、ムスカリン性 ACh 受容体を動員し NO シグナルカスケードを誘導してイオンチャネルの変容を起こしている可能性が示唆される。

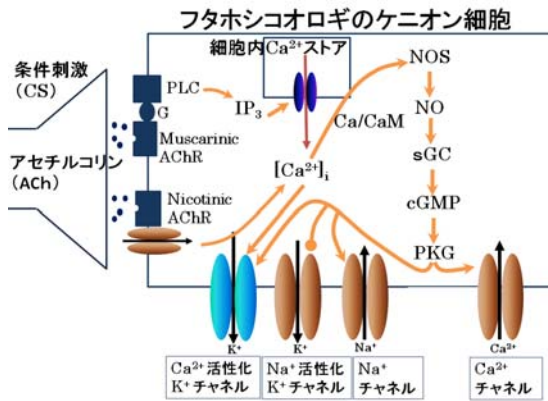


図5 フタホシコオロギのケニオン細胞に同定されたイオンチャネルのムスカリン性ACh受容体を介したシグナル伝達制御

## 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1件)

- ① Terazima & Yoshino Modulatory action of acetylcholine on the Na<sup>+</sup>-dependent action potentials in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain. *Journal of Insect Physiology*, 56:1746-1754(2010), 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 長谷部政治、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現するK<sub>Na</sub>チャネルのNOシグナル伝達系による抑制性制御、第82回日本動物学会大会、2011年9月21日、クリスタルホール (旭川)
- ② 井上重毅、吉野正巳、フタホシコオロギの解離ケニオン細胞は高い自発活動能を持つ、第82回日本動物学会大会、2011年9月21日、クリスタルホール (旭川)
- ③ 中村敦直、吉野正巳、フタホシコオロギのケニオン細胞に見られるGABA<sub>B</sub>受容体による長期抑制作用、第82回日本動物学会大会、2011年9月22日、クリスタルホール (旭川)
- ④ 村田馨、吉野正巳、フタホシコオロギのケ

ニオン細胞に見られる複合活動電位に対するアセチルコリンの作用、第82回日本動物学会大会、2011年9月22日、クリスタルホール (旭川)

- ⑤ 辻内裕樹、小境久美子、田中希依、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現するCa<sup>2+</sup>チャネルのNOシグナル伝達系による制御、第82回日本動物学会大会、2011年9月22日、クリスタルホール (旭川)

- ⑥ 小境久美子、吉野正巳、フタホシコオロギの嗅覚連合中枢ニューロンに発現するイオンチャネルとその調節、第81回日本動物学会大会、2010年9月23日、東京大学 (東京)

- ⑦ 中村敦直、吉野正巳、フタホシコオロギのケニオン細胞に見られるGABA<sub>B</sub>様受容体とK<sub>Na</sub>チャネルの機能連関、第81回日本動物学会大会、2010年9月23日、東京大学 (東京)

- ⑧ 吉野正巳、ムスカリン様受容体によるキノコ体ケニオン細胞のイオンチャネル制御、第31回日本比較生理生化学会大会、2009年10月23日、千里ライフサイエンスセンター (大阪)

## 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・教授

研究者番号：20175681

### (2)研究分担者

(無し)

### (3)連携研究者

(無し)