

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15日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770070

研究課題名（和文） 摂食行動と産卵行動のスイッチに関わる中枢神経回路の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the central neural circuit involved in the switch of feeding and egg-laying behavior

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、軟体動物アメフラシを用いて摂食行動と産卵行動の切り替えに関わる中枢神経回路の機能解析を主な目的とした。口球神経節に存在する同定ニューロンにガラス微小電極を刺入して、産卵ホルモンの効果を電気生理学的に調べた。産卵ホルモンにより運動ニューロンの活動が修飾され、閉口開始時期の早くなることが示唆された。この現象は口の運動パターンが食物を吐き出す方向へ変化することを表しており、産卵時の動物個体に見られる摂食量の減少に寄与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was functional analysis of the central neural circuit involved in the switch of feeding and egg-laying behavior in *Aplysia kurodai*. I investigated the effects of the egg-laying hormone (ELH) on the activity of identified buccal neurons using conventional electrophysiological techniques. The modulation in spike activity of buccal motor neurons by ELH will cause early onset of jaw closing. This result suggests that ELH changes the buccal motor program from ingestion to rejection, which contributes to a decrease in food intake during egg-laying behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総 計	1,500,000	450,000	1,950,000

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

海産軟体動物アメフラシ（*Aplysia*）の摂食行動に関わる神経回路は、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（図1）。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。

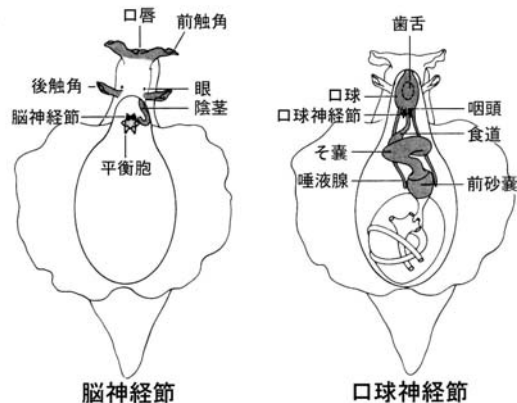


図 1 アメフラシの脳神経節と口球神経節の支配領域 (灰色部)。Kandel, 1979 より改編。

アメフラシのライフサイクルは約一年で、産卵行動は 4～8 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り、両性腺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 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。その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 (GnRH) が分泌されて、脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン (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。

これまで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。本研究では、摂食行動と産卵行動のそれぞれについて神経回路が解明されている軟体動物アメフラシを実験動物として用いて、両行動のスイッチに関わる中枢神経回路の機能解析を主な目的とした。特に、産卵時における摂食行動抑制に関わる摂食神経回路の可塑的变化に着目して研究を行った。

3. 研究の方法

アメフラシの摂食量を測定するための行動解析、個々のニューロンの応答を測定するためのガラス微小電極を用いた細胞内記録法および筋電位を測定するための吸引電極を用いた細胞外記録法による電気生理学的解析を行った。

(1) 行動解析

行動実験は、約 15℃の人工海水を満たした水槽中に吊るしたかごに動物 (50～150 g) を 1 個体ずつ入れ実施した。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。コントロール実験を 3 日間行い摂食前と摂食 1 時間後の海藻重量を毎日測定した。1 時間あたりに消費した海藻重量の割合 (%) を 1 日当たりの摂食量とした。次の 3 日間で ELH の効果を検討した。ELH (最終体内濃度 20 nM) を人工海水に溶かして動物の腹腔内に投与した。対照実験として、人工海水のみを腹腔内投与した。投与 10 分後に海藻を水槽内に入れ、コントロール実験と同様に摂食量を測定した。

(2) 細胞内記録法

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 MA1 (multi-action neuron)、開口運動ニューロン J01 (jaw-opening motor neuron) と閉口運動ニューロン JC2 (jaw-closing motor neuron) 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 の効果をアメフラシの単離脳神経節—口球神経節—口球筋標本を用いて調べた。個々のニューロンの応答は、2 M の酢酸カリウム溶液を充填したガラス微小電極を細胞内に刺入して電気生理学的手法により記録した。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同様に細胞内記録法により調べた。さらに、MA1 発火により誘発される JC2 の抑制性シナプス電流は、二電極膜電位固定法により JC2 の膜電位を

-40 mV に固定して記録した。

(3) 細胞外記録法

産卵時にアメフラシの摂食量が減少する理由の一つとして、口や顎の運動パターンの変化が起こることが予想される。そこでアメフラシの前頭部標本を用いて口球筋前部の筋電位を吸引電極で細胞外記録をとり、口唇への海藻味刺激により誘発される筋運動パターンに対する ELH の効果を調べた。口球筋前部 (I^1+I^3 筋) の中央 (mm) 領域は主に JC のスパイク活動、中前 (ma) 領域は主に JO のスパイク活動により筋電位が生じる。

4. 研究成果

本研究は、産卵時における摂食行動抑制に関わる摂食神経回路の可塑的変化を解明するため、アメフラシの海藻摂食量と口球神経節に存在するニューロン (MA1, JO1, JC2) に対する産卵ホルモン (ELH) の効果を調べた。

(1) 海藻摂食量に対する ELH の効果

動物にアオサまたはワカメといった海藻を 1 日 1 回与えた。通常飼育条件下での動物の海藻摂食量は、1 時間当たり 8.0 ± 1.3 g であった。初めの 3 日間の摂食量を 100% として、次の 3 日間で ELH を腹腔内投与した後の 1 時間当たりの相対摂食量を調べた。ELH 投与により 3 日間の平均摂食量は $22.8\% \pm 6.2\%$ へ有意に減少した (図 2A)。ELH 投与後 3 日間で摂食量は回復した。一方、腹腔内に人工海水を投与した動物群では変化が起きなかった (図 2B)。このことから ELH により摂食量の減少することが明らかになった。

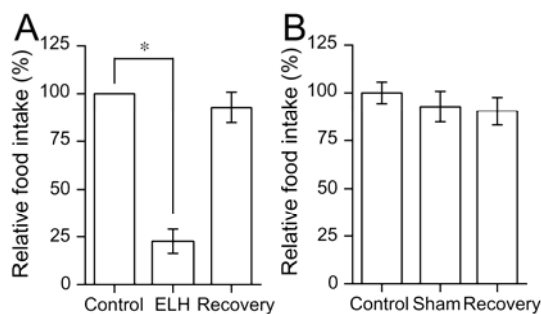


図 2 海藻摂食量に対する ELH の効果。A. ELH 投与時の摂食量変化。B. 人工海水投与時の摂食量変化 (Sham)。

(2) 自発的応答と擬似摂食様運動パターンに対する ELH の効果

アメフラシの口球神経節に存在する同定ニューロン MA1、JO1、JC2 に対して ELH の効果を検討した。ELH の添加前後で MA1、JO1、JC2 の静止膜電位に急速な変化は見られなかった。次に、MA1、JO1、JC2 の自発的応答に対する ELH の長期効果を調べたところ、JO1 に誘発される自発活動電位がコントロールに比べて減少するのに対して、JC2 に誘発さ

れる自発活動電位は ELH 添加後に増加することが明らかになった。一方、MA1 の発火頻度や発火期間は ELH の影響を受けなかった。

JC2 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、JC2 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 (図 4A)。Dn 値が大きいと JC2 の発火開始が遅くなり、小さいと早くなる。JC2 の自発的応答に対する ELH の効果を調べたところ、ELH 添加後に JC2 の Dn 値がコントロールに比べて有意に減少した。

次に、食道神経を電気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 の効果を調べた。擬似摂食応答時、JO1 に誘発されたスパイク数は ELH 添加 90 分後から有意に減少した (図 3A)。一方、JC2 のスパイク数は ELH 添加 15 分後から 2 時間後まで有意に増加した。JC2 のスパイク数の増加は、洗浄 1 時間後でも持続した (図 3B)。なお、擬似摂食応答時の MA1 のスパイク数は ELH の影響を受けなかった。また、JC2 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 4B)。

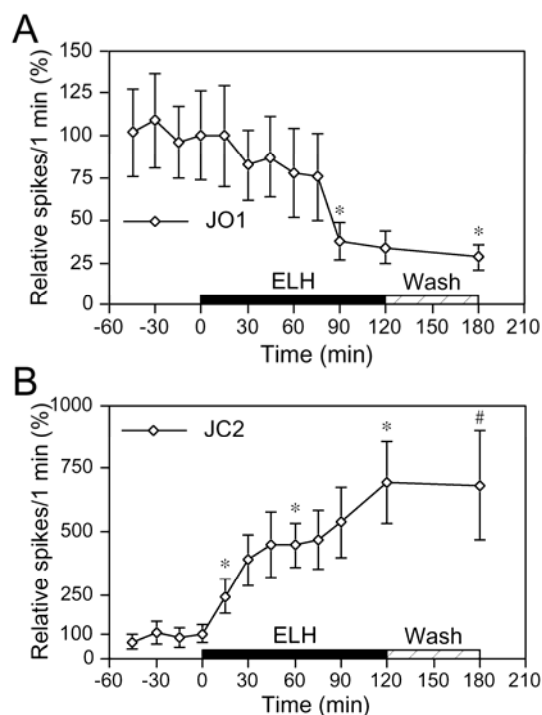


図 3 食道神経を電気頻回刺激したときに誘発される擬似摂食様運動パターンにおける JO1 (A) と JC2 (B) のスパイク数に対する ELH の経時効果。

MA1 は単シナプス性に JC2 を抑制することが知られている。JC2 の発火開始の遅れは、主に MA1 発火により生じると考えられる。そこで MA1 発火により誘発される JC2 の抑制性

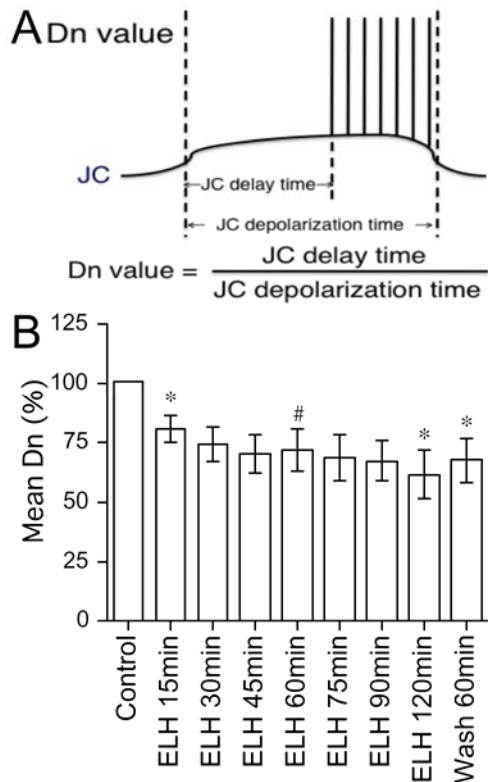


図4 Dn 値に対する ELH の効果。A. Dn 値の算出法。B. 擬似摂食様運動パターン時の JC2 の発火開始時期に対する ELH の経時効果。

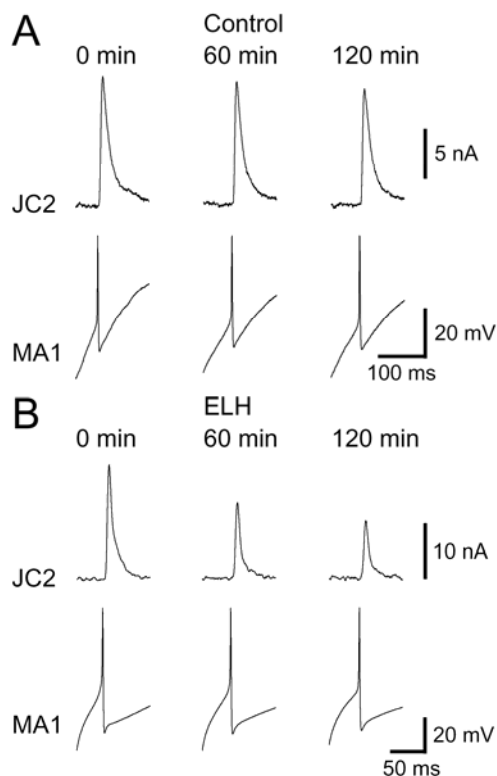


図5 MA1 発火により誘発される JC2 の抑制性シナプス電流に対する ELH の効果。A. コントロール。B. ELH 添加 60, 120 分後。

シナプス電流に対する ELH の効果を検討した。コントロール実験では、MA1 発火により誘発された JC2 の抑制性シナプス電流の大きさは時間とともにわずかに減少した (図 5A)。一方、ELH を添加すると抑制性シナプス電流は徐々に減少して、120 分後にはおよそ半分の大きさになった (図 5B)。コントロール時には MA1 から JC2 への抑制性入力により JC2 の発火が抑えられるが、ELH 添加時には MA1 と JC2 の抑制性シナプス電流が減少することで JC2 の発火開始時期が早くなることが明らかになった。

(3) 口球筋運動パターンに対する ELH の効果

口唇への海藻味刺激により、顎に相当する口球筋にリズムカルな運動 (筋電位) が誘発される。海藻摂食時には、口球筋前部 (I^1+I^3 筋) の中前 (ma) 領域の筋活動に続いて、中央 (mm) 領域に筋活動が生じる。ELH を口球神経節に添加して口唇部を海藻抽出液で刺激すると、ma 領域とほぼ同時に mm 領域の筋活動の生じる傾向が観察された。mm 領域の筋電位は主に JC の活動により大きな応答が生じる。mm 領域の筋活動の位相変化は上記の JC の位相変化に起因すると考えられる。

(4) まとめ

以上の結果、ELH により J01 と JC2 の運動パターンが修飾され、開口運動が減少するとともに閉口開始時期の早くなることが示唆された。これは過去の研究で明らかになった口の運動パターンが食物を吐き出す方向へ変化することに類似しており、産卵時の動物個体に見られる摂食量の減少に寄与していると考えられる。アメフラシは口唇や前触角を巧みに操り岩場に卵を産み付ける。摂食と産卵に使用する器官に共通性があるため、どちらか一方の行動を抑制するように中枢神経回路レベルで調整していると考えられる。今後は、ELH により引き起こされる中枢神経回路の変化がどのような細胞内情報伝達系を用いているのか検討する予定である。

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 3 件)

- (1) Narusuye, K., Nagahama, T. Distinct activity changes in jaw-opening and jaw-closing motor neurons induced by egg laying hormone in *Aplysia kurodai*. *Journal of Physiological Sciences* 査読無 62 Suppl. 1: S106-S106, 2012.
- (2) Narusuye, K., Nagahama, T. Activity changes of buccal motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression in *Aplysia kurodai*. *Comparative*

Physiology and Biochemistry 査読無 28
Suppl.: 175-175, 2011.

- (3) Narusuye, K., Nagahama, T. Activity changes of jaw-closing motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression during reproductive periods. *Neuroscience Research* 査読無 68 Suppl. 1: e391-e391, 2010.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 成末憲治、産卵ホルモンによるアメフラシ開口運動ニューロンと閉口運動ニューロンの活動変化の相違、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 29 日、松本文化会館
- (2) Narusuye, K. Activity changes of buccal motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression in *Aplysia kurodai*. 第 8 回国際比較生理生化学会議 (ICCPB2011)、2011 年 6 月 3~4 日、名古屋国際会議場
- (3) 成末憲治、産卵期の摂食量減少に関わる産卵ホルモンによる閉口運動ニューロンの活動変化、第 33 回日本神経科学大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 4 日、神戸国際会議場

〔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 23 年度 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～ KAKENHI、HT23083、「体の中にある物質を分ける、見る、測る。」(代表：福島健、分担：成末憲治、他 13 名、中高生 85 名対象)、2011 年 7 月 31 日、東邦大学薬学部
- (3) 平成 22 年度 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～ KAKENHI、HT22076、「くすりってどうやってできるの？」(代表：加藤恵介、分担：成末憲治、他 15 名、中高生 91 名対象)、2010 年 8 月 20 日、東邦大学薬学部

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