

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570091

研究課題名(和文)セロトニントランスポーター遺伝子多型と学習行動との関連

研究課題名(英文)Association between the serotonin transporter polymorphism and learning behavior

研究代表者

定本 久世 (SADAMOTO, HISAYO)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：70374220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニントランスポーターはシナプス間隙に放出されたセロトニンを再取り込みする分子であり、セロトニンによる神経伝達を直接変化させる。軟体動物モノアラガイでは味覚学習にセロトニン分泌細胞が重要であることから、本研究ではモノアラガイのセロトニントランスポーターmRNA 3'UTR上の繰り返し配列と味覚学習行動、その関連分子メカニズムについて解析した。その結果、長さの異なる2種類の繰り返し配列がゲノム上の遺伝子多型として存在し、一方を優先的にmRNAとして発現していた。同配列は規則性のあるヘアピン構造をとることが予測され、特定タンパク質が結合すること、学習行動との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The serotonin transporter removes the neurotransmitter serotonin from the synaptic clefts and regulates the extracellular serotonin level. In the mollusc *Lymnaea stagnalis*, a large serotonergic neuron has been proposed as the key neuron in the neuromodulatory circuit for conditioned taste aversion learning (CTA), based on the behavioral experiments. In this study, we focused on variable number of tandem repeat (VNTR) in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of *Lymnaea* serotonin transporter and the genome polymorphism, and the effects on animal behavior. We found two types of the VNTR (16 or 24 repeats) as the genome polymorphism, and each animal expressed either of one in the brain. We also obtained results indicating the effects of the VNTR on the animal behaviors, and the RNA-protein interaction specific for the VNTR.

研究分野：動物生理・行動

キーワード：セロトニントランスポーター 遺伝子多型 動物行動 3'UTR

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セロトニントランスポーター (5HTT) は、シナプス間隙に放出されたセロトニンをシナプス前細胞に再取り込みし、伝達物質を直接的に調節する分子である。同分子は抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のターゲットとしても知られ、セロトニン量調節を介して動物行動を大きく変化させる。

これまでに、5HTT 発現に関わる遺伝的要因についてゲノム、RNA の非コード領域上の遺伝子多型との関連が示されてきた。特に、ヒトの精神疾患と 5HTT プロモーター上の反復塩基配列 (variable number of tandem repeat, VNTR) との関連について複数の報告がある。しかし、人種や性別により結果が異なるなど、遺伝的背景や神経メカニズムが複雑な実験系では遺伝子多型と行動変化との関連解析が容易でないことが示されている。また、哺乳類 5HTT のイントロン上 VNTR や、mRNA 3' UTR 上の塩基置換に関する報告もあるが、関連する分子機構は解明されておらず、出された結果に一致した見解がない状態が続いてきた。

以上のように、遺伝子多型による 5HTT 発現調節機構の存在と、行動変化との関連が示されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。また哺乳類など複雑な神経系を持つ動物では、遺伝的要因と行動変化との関連を直接的に探究することは困難であった。

軟体動物モノアラガイの味覚学習には左右一対の特定セロトニンニューロン (cerebral giant cell, CGC) が重要であり、関係する神経回路内のセロトニンニューロンは CGC のみであり、CGC ではモノアラガイ 5HTT が高発現している。

2. 研究の目的

軟体動物モノアラガイを用い、5HTT の遺伝子多型、mRNA 上の VNTR による動物行動変化と関連する分子メカニズムを解析する。

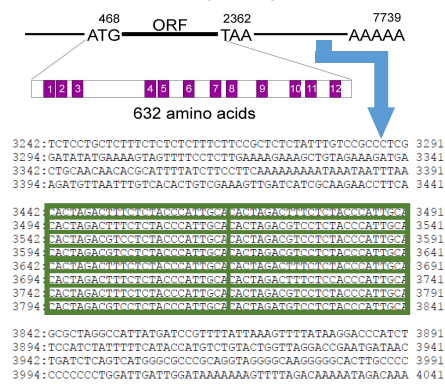
3. 研究の方法

- (1) 5HTT mRNA 3' UTR 上の VNTR 配列解析
- (2) ゲノム DNA 上の VNTR 配列解析
- (3) VNTR 配列特異的に結合するタンパク質の同定
- (4) VNTR 配列の 2 次構造予測
- (5) 味覚嫌悪学習と mRNA 上 VNTR 配列との関連解析

4. 研究成果

(1) 5HTT mRNA 3' UTR 上の VNTR 配列解析
モノアラガイの 5HTT mRNA は、約 5400 ~ 5600 塩基の長い 3' UTR を持つ。この 3' UTR の第 3000 ~ 4000 塩基の間に、約 25bp の類似した配列が繰り返し出現する VNTR 配列があ

ることが分かった (図 1)。



(図 1)

まず、個体ごとの mRNA 上 VNTR 配列解析を行った。各個体中枢神経系由来の cDNA サンプルを作製し、VNTR 部を挟むプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、2 種類の長さの PCR 産物が見られた。12 個体中 2 個体サンプルでは 24 回繰り返し配列 (以降 24VNTR とする) が、その他の 10 個体のサンプルでは 16 回繰り返し配列 (以降 16VNTR とする) が増幅された。mRNA 上の VNTR 配列は 2 種類存在し、個体ごとにどちらか 1 種類のみを示すことが分かった。

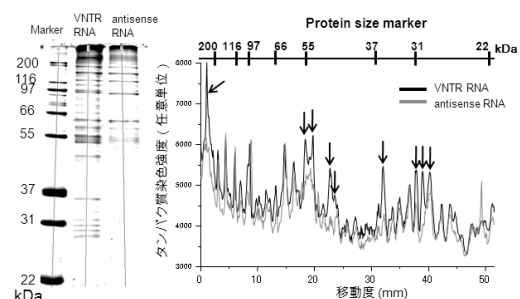
(2) ゲノム DNA 上の VNTR 配列解析

次に、5HTT mRNA 上の VNTR 配列の個体差がゲノム DNA の遺伝子多型によるものか、ゲノム上の VNTR 配列を解析した。32 個体を使用し、genomic PCR を行った結果、RT-PCR の結果と異なり、一個体において 16VNTR と 24VNTR の 2 種類が増幅される例もあった。また、同一卵塊の個体でも VNTR 配列が同じではなかった。24VNTR 単独は 11 個体、16VNTR 単独は 13 個体で、両方現れたのは 8 個体だった。

(1)(2) に実験から、5HTT の VNTR には 16 回と 24 回型の遺伝子多型が存在し、mRNA として一方を優先的に発現することが示された。

(3) VNTR 配列特異的に結合するタンパク質

biotin 標識された 5HTT VNTR の合成 RNA をプローブとし、中枢神経系抽出タンパク質と混合した RNA - タンパク複合体を streptavidin ビーズで回収した。プローブは 24VNTR の sense 鎖と、コントロールとして antisense 鎖を合成した。その結果、RNA 結合タンパク質量に差が見られた部分を矢印で示した。SDS-PAGE によって sense 鎖のみに結合するタンパク質が多くみられた。



5HTT mRNA の VNTR に結合するタンパク質が中枢神経系内に存在することが示唆された。これらのバンドからタンパク抽出、同定を試みたがタンパク同定には至っていない。

(4) VNTR 配列の 2 次構造予測

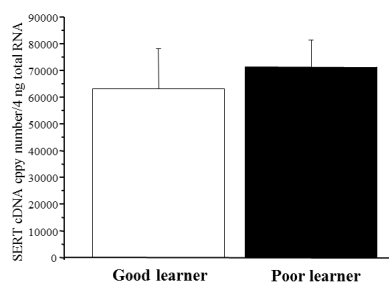
解析ソフト (RNA secondary structure prediction, Brodsky et al., 1992, 1995) と他複数の解析プログラムを用いて 16VNTR と 24VNTR の 2 次構造を予測したところ、一定間隔で、同程度の大きさを示す繰り返しヘアピン構造をとることが予測された。また、antisense 鎖配列についても同様の解析を行ったところ、ソフトにより 2 次構造予測不能である場合、様々な大きさのループが不規則に並ぶなど結果が一定でなく、2 次構造予測が困難であった。

(5) 味覚嫌悪学習との関連解析

各個体が持つ 5HTT mRNA の VNTR 配列と、学習能力との関連を調べた。モノアラガイに繰り返し条件付けを行い、個体由来の cDNA サンプルを作製した後、VNTR 配列を調べた。その結果、24VNTR を持つ個体は学習成績の良いグループ中 30% 存在するが、学習成績が悪いグループには含まれていなかった。

(1)(2) より mRNA 上の VNTR 配列解析では個体群の中には 24VNTR を発現する個体が 20-30% ほど現れることが予測されるが、学習成績の悪いグループは異なる傾向を示すことがわかった。

また、リアルタイム PCR による発現量解析では、学習成績による 5HTT mRNA の量差は見られなかった (図 2)。



(図 2)

モノアラガイでは 5HTT 抗体がないためタンパク定量や細胞内局在は解析できていない。このため、これらの解析に加えて、神経細胞内のタンパク質挙動のライブイメージングを目指した。蛍光タンパク質によるタンパク質標識により培養神経細胞におけるシナプス機能分子の挙動解析を行った (学会発表 2, 3)。また、行動変化に関連する発現遺伝子の網羅的な解析を目指し、次世代シーケンスによるモノアラガイの transcriptome データの構築を行った (論文 1, 学会発表 4)。

これまでの実験から VNTR 遺伝子多型、mRNA 上の VNTR 配列と学習成績が関連する可能性が示された。ただ、これらは 5HTT 遺伝子発現量とは関連していない。先の実験 (4 X 5) により、RNA の VNTR 配列は規則的なヘアピン構造をとることが予測され、特定タンパク質と 5HTT mRNA 上の VNTR 配列との相互作用がおこることが示されている。味覚学習に関わるセロトニン分泌細胞内において、関連タンパクによる 5HTT の VNTR の翻訳機構への関与、あるいは mRNA の細胞内局在への関与も考えられる。

本研究では軟体動物を用いているが、哺乳類 5HTT mRNA 3' UTR にも VNTR 構造があること、培養細胞実験系では VNTR が mRNA の寿命に関係するとの報告もある。遺伝子多型および mRNA 上の VNTR を含むセロトニン調節メカニズムについて、動物種を越えた研究が今後も発展していくことが期待される。

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 9 件)

1. H. Sadamoto, H. Takahashi, T. Okada, H. Kenmoku, M. Toyota, Y. Asakawa: De novo sequencing and transcriptome analysis of the central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* by deep RNA sequencing. *PLoS One* 7:e42546, 2012.
2. S. Kobayashi, R. Matsuo, H. Sadamoto, S. Watanabe, E. Ito: Excitatory effects of GABA on procerebrum neurons in a slug. *J Neurophysiol* 108:989-998, 2012.
3. S. Kobayashi, E. Ito. GABAergic effects on the slow oscillatory neural activities in the procerebrum of *Limax valentianus*. Short communication. *Acta Biol Hung* 63: Suppl2:91-5, 2012.
4. T. Watanabe, H. Sadamoto, H. Aonuma: Molecular basis of the dopaminergic system in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Invert Neurosci* 13:107-123, 2013.
5. J. Murakami, R. Okada, H. Sadamoto, S. Kobayashi, K. Mita, Y. Sakamoto, M. Yamagishi, D. Hatakeyama, E. Otsuka, A. Okuta, H. Sunada, S. Takigami, M. Sakakibara, Y. Fujito, M. Awaji, S. Moriyama, K. Lukowiak, E. Ito: Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci* 33:371-383, 2013.
6. R. Matsuo, S. Kobayashi, K. Wakiya, M. Yamagishi, M. Fukuoka, E. Ito. The cholinergic system in the olfactory

- center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 522(13):2951-66, 2014.
7. S. Watanabe, F. Takanashi, K. Ishida, **S. Kobayashi**, Y. Kitamura, Y. Hamasaki, M. Saito. Nitric Oxide-Mediated Modulation of Central Network Dynamics during Olfactory Perception. *PLoS One* 10(9):e0136846, 2015.
 8. R. Matsuo, R. Fukata, M. Kumagai, A. Kobayashi, **S. Kobayashi**, Y. Matsuo. Distribution of histaminergic neurons and their modulatory effects on oscillatory activity in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 524(1):119-35, 2016.
 9. R. Matsuo, M. Tanaka, R. Fukata, **S. Kobayashi**, H. Aonuma, Y. Matsuo: Octopaminergic system in the central nervous system of the terrestrial slug *Limax*. *J Comp Neurol* 2016 May 17 [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計4件)

1. **H. Sadamoto**, M. Ohmichi, N. Hama, **S. Kobayashi**. The brain responses to hunger and satiation in mollusk *Lymnaea stagnalis*. 日本比較生理生化学会第34回大会, 総合研究大学院葉山キャンパス 7月6日(2012)
2. **H. Sadamoto**, T. Kuriu, Y. Yanagawa, S. Konishi. 海馬抑制性シナプス形成にともなう VAMP4 細胞内分布と機能の変化 Synaptic localization and function of VAMP4 in developing inhibitory neurons. 第37回日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜 9月10日(2014)
3. **H. Sadamoto**, S. Ohmune, A. Matsubara, K. Sobue, S. Okabe, T. Kuriu, S. Konishi. 興奮性シナプス後部足場蛋白質 GKAP/SAPAP1 アイソフォームのシナプス形成期における局在解析 Differential localizations of GKAP/SAPAP1 isoforms in developing hippocampal neurons. 第38回日本神経科学学会大会, 神戸国際展示場 7月29日(2014)
4. **H. Sadamoto**, H. Takahashi, T. Okada, H. Kenmoku, M. Toyota, Y. Asakawa. *De novo* sequencing and transcriptome analysis of non-model animal by deep RNA sequencing. ISPSA2015 徳島文理大学 8月31日(2015)

〔図書〕(計5件)

1. 「研究者が教える動物飼育第1巻 -ゾウリムシ, ヒドラ, 貝, エビなど」(共著) 針山 孝彦, 小柳 光正, 嬉 正勝, 妹尾 圭司, 小泉 修, 日本比較生理生化学会

(編集), 共立出版 (2012/5/25), ISBN-10: 432005718X2.

2. 「Methods in Molecular Biology」(共著) Minou Bina Editor, **H. Sadamoto**, H. Muto: Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy (FCCS) to Observe Dimerization of Transcription Factors in Living Cells. 977:229-241, 2013.
- 3 - 5. 尾崎 まみこ, 藍 浩之, **定本 久世**, 村田 芳博, 吉村 和也, 神崎 亮平, 日本比較生理生化学会「研究者が教える動物実験」(共著, 編集) 全3巻, 単行本, 共立出版 (2015/7/24), ISBN-10: 4320057724, 4320057732, 4320057740

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

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・講師
研究者番号: 70374220

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小林 卓 (KOBAYASHI SUGURU)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号: 50325867