

平成22年6月14日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370030
 研究課題名（和文） 単一ニューロン内の転写・翻訳機構から解明する動物行動の変容機構
 研究課題名（英文） Behavioral changes clarified from transcriptional and translational mechanisms in a single neuron of a snail

研究代表者

伊藤 悦朗 (ITO ETSURO)
 徳島文理大学・香川薬学部・教授
 研究者番号：80203131

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、遺伝子発現から動物行動の変容までの一連の機構を階層性に沿って解明することであり、そのための手法もあわせて開発することである。そこでヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習機構に着目した。まずはこの学習に関与しているニューロン1個内での転写調節因子を、mRNA・タンパク質レベルで定量する方法を開発し、長期記憶時の量的変化を明らかにした。さらには、ニューロン1個内の変化から個体行動変容を理解するためのボトムアップ研究を行った。

研究成果の概要（英文）： The aims of the present study were (1) to clarify a series of mechanisms from gene expression to behavioral changes in a snail as well as (2) to develop the experimental methods to achieve the first purpose. We here noticed the conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. We have first developed the determination method for mRNA and protein of CREB in a single neuron and demonstrated the quantitative changes in these molecules during the long-term memory. Then we have also attempted to establish the bottom-up studies from a single neuron to behavioral changes. Our present findings have paved the new way for studies of neurobiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：神経生物、神経行動、行動生理、動物生理化学

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者のライフワークとしての研

究目的は、1つのニューロン内の特定の遺伝子発現が、どのように神経ネットワークの生理学的または形態学的変化を誘導し、そして

動物個体の行動変容を引き起こすのか、その機構を解明する手法を開発しつつ、実際に、遺伝子発現から動物行動変容までを、生物の階層性に沿った形で詳細に解明することである。

本研究代表者はヨーロッパモノアラガイを実験動物として用い、その味覚嫌悪学習機構を研究している。その機構の鍵を握るキー・ニューロン (Cerebral Giant Cell : CGC) をすでに同定しており、本研究ではこの神経細胞に着目する。これまで本代表研究者らが階層性をトップダウンで降りてくることによって得てきた結果から、長期記憶形成時にこのキー・ニューロン内では、cAMPの上昇→A キナーゼの活性化→転写因子 cAMP Response Element Binding Protein (CREB1, 転写促進型) の活性化が起こっていることが分かっている。また学習を施した個体標本用いた実験結果から、このキー・ニューロン CGC 内での CREB1 の活性化は、それに続く介在ニューロンおよび運動ニューロンでの EPSP 増強 (長期促進) をもたらすことも示された。これはシナプス前細胞であるキー・ニューロン内において CREB1 の活性化が神経伝達物質 (セロトニン) の放出量を増加させていることに起因していた。これが味覚嫌悪学習を長期記憶として保持される機構である。

そこで次に、モノアラガイの CREB をクローニングし、in situ ハイブリダイゼーション法ならびに免疫組織化学法によって、それらが局在するニューロンも同定した。上記のキー・ニューロンにおいても CREB1 および転写抑制型の CREB (CREB2) の mRNA の存在が確認されている。以上の結果からモノアラガイを用いると、特定遺伝子の発現変化→特定ニューロンの機能変化→特定神経ネットワークでの伝達効率の変化→特定行動の変容という一連の階層性に正確に沿って、ボトムアップ法での解析が可能となることがわかった。

これらに引き続き、本研究代表者らは細胞 1 個中の mRNA の定量方法の開発に成功した。この方法はリアルタイム PCR 法をアレンジしたもので、実際にキー・ニューロンである CGC では、1つの細胞の中に CREB2 の mRNA が数百コピー存在し、しかも味覚嫌悪学習によって半分以下に激減することを示すことができた。逆に予想に反し、CREB1 は数コピーしかなく、これは測定範囲外であり、しかも学習によって増加しないこともわかった。したがって、いよいよ本研究においては、CREB のタンパク質の量の変化に着目し、キー・ニューロン 1 個中のタンパク質量の方法を開発しながら、最終的に、その CREB タンパク質の量の変化と、神経ネットワークレベルでの変化との関係を明ら

かにする段階に至った。

2. 研究の目的

学習・記憶に関与しているニューロン 1 個内の CREB のタンパク質を定量する方法を開発しなければならない。ここで言う定量とは、タンパク質の個数を正確に計測することを意味する。さらには、セミインタクト標本系を用いて、CREB の量的変化が行動変容にどのような影響を与えるのか、階層性をボトムアップで昇ることによって、その機構を詳細に調べる。このボトムアップの研究を成し遂げなければ、遺伝子発現と行動変容との関連を「必要十分条件」として正確に理解したことにはならない。

(1) 単一ニューロン内のタンパク質の定量 :

まずは、単一ニューロン内のタンパク質の定量に挑戦する。長期記憶形成時に CREB タンパク質が転写調節因子として働くことは良く知られており、本代表研究者らもその結論に達している。本代表研究者らの研究から、長期記憶の形成とともに、CREB mRNA の量が増加することはわかったが、実際に CREB タンパク質分子の量が増加するのかわかっているかわかっていない。CREB ファミリーには、転写促進型の CREB1 と抑制型の CREB2 の両者が存在するという事実もあり、CREB タンパク質の量的なダイナミクスを明らかにしなければ、ただ単に CREB が長期記憶形成に大事だという主張をいくら繰り返しても意味がない。そこで、その現状を打破するために、たった 1 つのニューロン内のタンパク質の定量方法の開発に挑む。

(2) ボトムアップによる解析法の確立 :

次にこの計測方法を用いて、学習個体から単離してきた学習・記憶に関わる特定の単一ニューロンでの CREB タンパク質の量的変化を確認する。その後、今度は逆に、その神経細胞中の CREB の量を人為的に変化させることによって、行動変容に至るどの階層性でどのような影響を与え得るのかを、階層性をボトムアップで昇って調べて行く。ここで言う階層性とは、「遺伝子発現」 ↔ 「ニューロン内の情報伝達変化」 ↔ 「神経ネットワークの可塑性」 ↔ 「脳の機能変化」 ↔ 「行動変容」 の関係を指す。

3. 研究の方法

(1) 単一ニューロン内の CREB タンパク質の定量方法の開発 :

遺伝子から転写された mRNA はプロセッシングを受けるため、タンパク質の量との相関関係の証明は実は難しい場合がある。そのため、タンパク質の量の変化を調べるには、タンパク質そのものを定量する方法を別途開発する必要がある。しかし、今までの計測法では生体内に比較的多く存在するタンパク質は測定できても、ターゲットのタンパク質が微量の場合は極めて困難であった。最近になって、極微量なタンパク質の定量のための超高感度測定法の基本が本代表研究者らによって開発された。

この極微量タンパク質の超高感度測定法は、酵素サイクリング法と酵素免疫測定法 (ELISA 法) との組み合わせにより、超高感度化を目指したものである。理論的には既存の酵素免疫測定法より 1 千万～1 億倍高感度となり、1 個の細胞内のタンパク質 1 個の定量が可能となる。このように「世界に類を見ない超高感度測定法の開発」を、モノアラガイの脳から単離したニューロンを用いて、実際に使用できるレベルまで押し上げるための開発を行う。

ここで CREB タンパク質を定量するために、CREB の抗体に酵素を標識する。それを用いて、キー・ニューロンの Cerebral Giant Cell (CGC) 1 個の中の CREB を定量する。CREB1 と CREB2 それぞれの抗体を用いれば、おのおのが定量できるはずである。この方法を確立し、学習個体と非学習個体とで単一ニューロン内の CREB タンパク質量の違いが明らかとなる。

(2) ボトムアップ研究法の確立：

セミインタクト標本作製し、キー・ニューロンである Cerebral Giant Cell (CGC) 内の cAMP 濃度、A キナーゼの活性化程度、ならびに CREB1 のリン酸化程度を薬理的に変化させ、シナプス後細胞群での長期促進の大きさを測ることによって、学習効果の一部をミミックしてみる。そのためにも単一ニューロン内の cAMP 濃度を定量化するための方法を合わせて開発する。これらの実験に引き続いて RNAi をインジェクションし、CREB の遺伝子発現量を減少させた際の長期促進の変化を観察する。

さらには、セミインタクト標本系では *in vitro* 学習を施す。すなわち、個体味覚嫌悪学習と同じ味覚刺激をくちびるに与えるか、またはそれに替わる電気刺激をキー・ニューロンに与えて、シナプス後細胞群での長期促進の大きさを指標にし、学習の成立・長期記憶の形成が起きているか否かを判断する。すなわち、キー・ニューロンからシナプス後細胞群への長期促進の変化を観察するボトムアップと、*in vitro* 学習から長期促進の変化を観察するトップダウンとを組み合わせ、

階層性に無理なく全体の機構を説明できるようにデータを揃える。

4. 研究成果

(1) 単一ニューロン内でのタンパク質の超高感度定量：

まずは CREB のタンパク質の量の変化に着目し、キー・ニューロン 1 個中のタンパク質定量の方法を開発することを試みた。具体的には、学習・記憶に関与しているニューロン 1 個内の CREB1 および CREB2 のタンパク質を定量する方法を、サンドイッチ ELISA 法として開発した。サンドイッチ法なので、CREB1 および CREB2 おのおのについて 2 種類の抗体を用意した。そして、都合 4 種類の抗体の特異性などを調べ、ELISA 法に発展させた。一方でこの ELISA 法をさらに高感度化するために、酵素サイクリング法を組合せて、その至適条件の検討を行った。酵素サイクリング法の脱水素酵素のターンオーバー数の向上を検討し、最適値 (6000 回転/分) を見出した。さらにはこの酵素サイクリング法に伴うブランク値の上昇について検討し、それを抑えるための対策を考えた。その結果、基質を修飾することが必要であることがわかり、これは有機化学の研究者とともに作製することになった。

(2) ボトムアップ解析：

次に、CREB タンパク質の量やリン酸化の程度と、神経ネットワークレベルでの変化を明らかにする段階に移った。そのためボトムアップ研究の方法を開発し始めた。学習効果をミミックするような実験系を、セミインタクト標本系で作上げられれば、ボトムアップ法の解析が可能となる。ボトムアップ法の解析では、生理学的または生化学的なフィクティブな変化を測定することになる。セミインタクト標本作製し、キー・ニューロンである Cerebral Giant Cell (CGC) 内の cAMP 濃度、A キナーゼの活性化程度、ならびに CREB1 のリン酸化程度を薬理的に変化させ、シナプス後細胞群での長期促進の大きさを測ることによって、学習効果の一部をミミックすることを試みた。さらには、セミインタクト標本系で *in vitro* 学習を試みた。すなわち、個体味覚嫌悪学習と同じ味覚刺激をくちびるに与えるか、またはそれに替わる電気刺激をキー・ニューロンに与えて、シナプス後細胞群での長期促進の大きさを指標にし、学習の成立・長期記憶の形成が起きているか否かを判断した。すなわち、キー・ニューロンからシナプス後細胞群への長期促進の変化を観察するボトムアップと、*in vitro* 学習から長期促進の変化を観察するトップダウ

ンとを組み合わせて、機構全体を説明できるようにデータを集めた。

(3) cAMP 濃度定量と RNAi 実験

最後に、実験動物であるモノアラガイのセミインタクト標本を作製し、キー・ニューロンである Cerebral Giant Cell (CGC) 内の cAMP 濃度、A キナーゼの活性化程度、ならびに CREB1 のリン酸化程度を薬理的に変化させ、シナプス後細胞群での長期促進の大きさを測ることによって、学習効果の一部をミミックすることを試みた。生体内の単一細胞での cAMP 濃度測定はまだ誰も成功していない。そこでわれわれは cAMP 結合タンパク質を用いた濃度測定系の開発に着手した（現在もまだそれに取り組んでいる）。また、セミインタクト標本系での *in vitro* 学習について、その条件等を検討し、個体味覚嫌悪学習と同じ味覚刺激をくちびるに与えて、シナプス後細胞群での長期促進の大きさが変化するかを調べた。すなわち、これまで行ってきた学習のキー・ニューロンからシナプス後細胞群への長期促進の変化を観察するボトムアップと、最新の *in vitro* 学習から長期促進の変化を観察するトップダウンとを組み合わせ、階層性に無理なく全体の機構を説明できるようにデータを揃えることができたようになった。一方、キー・ニューロンに直接 RNAi をインジェクションし、それに味覚嫌悪学習を施した後、学習の成立不成立、ならびに長期記憶への移行の度合いなどの行動実験も検討している。

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 15 件)

- ① R. Sugai, S. Azamia, H. Shiga, T. Watanabe, H. Sadamoto, S. Kobayashi, D. Hatakeyama, Y. Fujito, K. Lukowiak and E. Ito: One-trial conditioned taste aversion in *Lymnaea*: good and poor performers in long-term memory acquisition, *J. Exp. Biol.*, 210: 1225-1237 (2007) 査読有
- ② K. Martens, M. Amarell, K. Parvez, K. Hittel, P. De Caigny, E. Ito and K. Lukowiak: One-trial conditioning of aerial respiratory behavior in *Lymnaea stagnalis*, *Neurobiol. Learn. Mem.*, 88: 232-242 (2007) 査読有
- ③ D. Hatakeyama, H. Aonuma, E. Ito and K. Elekes: Localization of glutamate-like immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the adult and developing pond snail, *Lymnaea stagnalis* L. *Biol. Bull.*, 213: 172-186 (2007) 査読有

有

- ④ H. Sadamoto, Z. Serfözö and E. Ito: Localization of serotonin transporter mRNA in the CNS of *Lymnaea stagnalis*, *Acta Biol. Hung.*, 59: 61-64 (2008) 査読有
- ⑤ R. Matsuo and E. Ito: Recovery of learning ability after the ablation of the procererebrum in the terrestrial slug *Limax valentianus*, *Acta Biol. Hung.*, 59: 73-76 (2008) 査読有
- ⑥ S. Kobayashi, M. Hattori and E. Ito: The effects of GABA on the network oscillations of the procererebrum in *Limax valentianus*, *Acta Biol. Hung.*, 59: 77-79 (2008) 査読有
- ⑦ R. Matsuo, K. Misawa and E. Ito: Genomic structure of nitric oxide synthase in the terrestrial slug is highly conserved, *Gene*, 415: 74-81 (2008)
- ⑧ M. Yamagishi, E. Ito and R. Matsuo: Redundancy of olfactory sensory pathways for odor-aversion memory in the terrestrial slug *Limax valentianus*, *J. Exp. Biol.*, 211: 1841-1849 (2008) 査読有
- ⑨ K. Aono, A. Fusada, Y. Fusada, W. Ishii, Y. Kanaya, M. Komuro, K. Matsui, S. Meguro, A. Miyamae, Y. Miyamae, A. Murata, S. Narita, H. Nozaka, W. Saito, A. Watanabe, K. Nishikata, A. Kanazawa, Y. Fujito, M. Yamagishi, T. Abe, M. Nagayama, T. Uchida, K. Gohara, K. Lukowiak and E. Ito: Upside-down gliding of *Lymnaea*. *Biol. Bull.*, 215: 272-279 (2008). 査読有
- ⑩ R. Matsuo, S. Kobayashi, S. Watanabe, S. Namiki, S. Iinuma, H. Sakamoto, K. Hirose and E. Ito: Glutamatergic neurotransmission in the procererebrum (olfactory center) of a terrestrial mollusk. *J. Neurosci. Res.*, 87: 3011-3023 (2009) 査読有
- ⑪ R. Matsuo and E. Ito: A novel nitric oxide synthase expressed specifically in the olfactory center. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386: 724-728 (2009) 査読有
- ⑫ R. Matsuo, S. Kobayashi, J. Murakami and E. Ito: Spontaneous recovery of the injured higher olfactory center in the terrestrial slug *Limax*. *PLoS one*, 5: e9054 (2010) 査読有
- ⑬ D. Hatakeyama, K. Mita, S. Kobayashi, H. Sadamoto, Y. Fujito, L. Hiripi, K. Elekes and E. Ito: Glutamate transporters in the central nervous system of a pond snail. *J. Neurosci. Res.*, 88: 1374-1386 (2010) 査読有
- ⑭ Y. Miyamae, M. Komuro, A. Murata, K. Aono, K. Nishikata, A. Kanazawa, Y. Fujito,

T. Komatsu, D. Ito, T. Abe, M. Nagayama, T. Uchida, K. Gohara, J. Murakami, R. Kawai, D. Hatakeyama, K. Lukowiak and E. Ito: Contrary effects of octopamine receptor ligands on behavioral and neuronal changes in locomotion of *Lymnaea*. Biol. Bull., 218: 6-14 (2010) 査読有

⑮ R. Matsuo, E. Kawaguchi, M. Yamagishi, T. Amano and E. Ito: Unilateral memory storage in the procererebrum of the terrestrial slug *Limax*. Neurobiol. Learn. Mem., 93: 337-342 (2010) 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① 定本久世 (2007) 「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 12 月 21 日, 横浜. (招待講演・日本生物物理学会奨励賞受賞)

② Ito, E. (2007) International Symposium “Time in Brain”, December 15-16, Okayama, Japan. (オーガナイザー)

③ 伊藤悦朗 (2007) 「生物における自律分散的な情報の生成・伝達機構」第 41 回自律分散システム部会研究会, 平成 19 年 11 月 28 日, 仙台. (招待講演)

④ Kobayashi, S. (2007) “The role of GABA neurotransmission in odor information processing in *Limax valentianus*” Neuroscience 2007, the 37th annual meeting of Society for Neuroscience, November 3-7, San Diego, USA.

⑤ Sadamoto, H. (2007) “The gene expression of serotonin transporter in the CNS of *Lymnaea stagnalis*” Neuroscience 2007, the 37th annual meeting of Society for Neuroscience, November 3-7, San Diego, USA.

⑥ Ito, E. (2007) “Altered gene activity correlated with long-term memory formation of conditioned taste aversion in *Lymnaea*” The 11th symposium on Invertebrate Neurobiology, August 26-29, Tihany, Hungary. (招待講演 Plenary Lecture)

⑦ Kobayashi, S. (2007) “GABAergic Neurotransmission of the Procererebrum Neurons in Odor Information Processing of the Terrestrial Slug *Limax valentianus*” The 11th symposium on Invertebrate Neurobiology, August 26-29, Tihany, Hungary.

⑧ Matsuo, R. (2007) “The genomic structure and the variants of nitric oxide synthase in the terrestrial slug *Limax valentianus*” The 11th symposium on Invertebrate Neurobiology, August 26-29,

Tihany, Hungary.

⑨ Sadamoto, H. (2007) “The gene expression of serotonin transporter according to the conditioned taste aversion learning in the CNS of *Lymnaea stagnalis*” The 11th symposium on Invertebrate Neurobiology, August 26-29, Tihany, Hungary.

⑩ Okada, R., Ikeno, H., Sasayama, N., Aonuma, H., Kurabayashi, D., and Ito, E. (2007) The dance of the honeybee: how do they dance to transfer the food information effectively? The 11th Symposium on Invertebrate Neurobiology, Aug 25-29, Tihany, Hungary.

⑪ Matsuo, R. (2007) “The genomic structure and the variants of nitric oxide synthase gene in the terrestrial slug *Limax valentianus*” Gastropod Neuroscience: Past Success, Future Prospects, June 5-9, University of Washington Friday Harbor Laboratories, USA.

⑫ Sadamoto, H. (2007) “Changes of CREB mRNA in *Lymnaea stagnalis* after learning” Gastropod Neuroscience: Past Success, Future Prospects, June 5-9, University of Washington Friday Harbor Laboratories, USA.

⑬ 定本久世 「ヨーロッパモノアラガイ単一神経細胞における学習・記憶に関わる遺伝子発現解析」日本比較生理生化学会第 30 回年会 (札幌) 吉田奨励賞受賞講演 2008 年 7 月 20 日 (招待講演) .

⑭ Ito, E., Sadamoto, H. (2008) Backward conditioning as inhibitory learning. 6th Forum of European Neuroscience, July 12-16, Geneva, Switzerland.

⑮ Matsuo, R., Yamagishi, M. and Ito, E. (2008) An either pair of tentacles is sufficient for odor-aversion learning of the terrestrial slug *Limax valentianus*. 6th Forum of European Neuroscience, July 12-16, Geneva, Switzerland.

⑯ 伊藤悦朗 「極微量タンパク質の超高感度測定法」次世代医療システム産業化フォーラム第 9 回例会 (大阪) 2009 年 12 月 15 日 (経済産業省・四国経済産業局推薦、招待講演)

⑰ Sadamoto, H., Ito, E. (2009) Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*. Neuroscience 2009 - Society for Neuroscience, October 21, Chicago, USA.

⑱ 伊藤悦朗 「極微量タンパク質の超高感度測定法」BioJapan2009 (横浜) 2009 年 10 月 8 日

⑲ 伊藤悦朗 「成茂記念動物科学シンポジウ

ム 動物学の“進化”この10年の概念と技術の進展」日本動物学会第80回大会（静岡）2009年9月17日（招待講演）

⑳ 伊藤悦朗「1つのニューロンの変化から見た動物行動の変容」九州動物生理学談話会（大分）2009年8月1日（招待講演）

(21) Ito, E., Hatakeyama, D., Mita, K., Kobayashi, S., Hiripi, L., Elekes, K. (2009) Glutamate uptake system in *Lymnaea stagnalis*. The Annual Main Meeting 2009 - Society for Experimental Biology, June 30, Glasgow, UK.

(22) Matsuo, R. (2009) Spontaneous recovery of olfactory center from injury in the terrestrial slug *Limax*. The 2nd Molluscan Neuroscience Meeting -Recent Advances and New Vistas-, February 12-15, 2009, Old San Juan, Puerto Rico.

〔図書〕（計7件）

① 定本久世 (2007)「リアルタイムPCRシステムを用いた微量 mRNA 定量法」日本比較生理生化学学会誌 24, 27-8.

② 伊藤悦朗 (2007)「ホルモンハンドブック新訂 eBook 版」日本比較内分泌学会編，南江堂.

③ 伊藤悦朗, 定本久世 (2007)「ナノバイオロジーによる単一細胞遺伝子発現解析，バイオとナノの融合Ⅱ 新生命科学の応用」北海道大学出版会.

④ 長沼圭一, 米山祐樹, 小林卓, 伊藤悦朗 (2008)「細胞分類・操作技術の最前線」シーエムシー出版.

⑤ 定本久世 (2009)「軟体動物腹足類の長期記憶形成に関わる分子メカニズム」比較生理生化学 26, 163-168.

⑥ 伊藤悦朗, 松尾亮太 (2009)「動物の多様な生き方」共立出版.

⑦ 伊藤悦朗, 岡浩太郎, 金澤昭良, 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 (2009)「身近な動物を使った実験2 ブラナリア, モノアラガイ・ナメクジ, ミミズ」三共出版.

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph07/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 悦朗 (ITO ETSURO)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号：80203131

(2) 研究分担者

箕田 康一 (MITA KOICHI)
徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：50281845

松尾 亮太 (MATSUO RYOTA)
徳島文理大学・香川薬学部・講師
研究者番号：40334338

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

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

(3) 連携研究者

なし