

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770081

研究課題名（和文）そしゃく行動に関わるインシュリンによる体液性調節機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of insulin-regulated mechanism affecting feeding behavior

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

軟体動物モノアラガイでは、そしゃく行動に関連する神経回路が明らかにされている。本研究ではインシュリンによる体液性調節機構とそしゃく行動との関連を調べた。その結果、インシュリン様遺伝子発現量は、数日間の飢餓・飽食によっては変化せず、またそしゃく応答との関連はなかった。また、インシュリンに応答し、ショ糖刺激によって生理学的性質が変化するニューロン群はそしゃく行動に直接的に関わる神経節中に存在することが示された。

研究成果の概要（英文）：

In the pond snail *Lymnaea stagnalis*, the neural circuitry underlying feeding is well described. I here studied the insulin-regulated mechanism affecting feeding behavior in the central nervous system (CNS) of *Lymnaea*. First, I examined the gene expression of molluscan insulin-related peptide II (MIP II) in the CNS. As a result, several days of hunger or satiation did not have effects on gene expression of MIP II. More, the feeding response to sucrose did not correlate to MIP II gene expression. Next, I examined to identify the neurons that respond to insulin or sucrose application to animals. The neurons that respond to those stimuli were in the buccal ganglia that contain the neural circuitry for feeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理

キーワード：行動学、神経化学、脳・神経、分子生物学、体液性調節

1. 研究開始当初の背景

動物行動は、神経回路性調節とともに、個体状態によって変化する体液性調節を受ける。特に、インシュリンによる体液性調節機構は

糖代謝経路だけでなく、癌、ストレス反応、免疫反応など多くの生理反応に関与することが知られる。脳・中枢神経系においても、神経細胞死やアルツハイマー等の病理発現

機構との関連が報告され、重要な基礎メカニズムの一つとして働いている。また、近年では線虫と哺乳類においてインシュリンが学習に参与するとの報告が続き、インシュリンが神経伝達物質調節や神経可塑性に関わることが明らかにされつつある。

しかしながら、インシュリン体液性調節機構について特定ニューロンや神経回路、動物行動変化という生物学的階層性を通して解析を進めた研究は未だなかった。

2. 研究の目的

軟体動物モノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) はニューロンが大きく、そしゃく行動や味覚学習の元となる神経回路が明らかである。また、先の報告でインシュリン様遺伝子 (molluscan insulin-related peptide II, MIP II) の発現量が、味覚学習の成績と関連することが示されていた。

本研究では軟体動物モノアラガイを用い、そしゃく行動関連神経回路に含まれる特定ニューロンにおいて、インシュリン作用機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) インシュリン様遺伝子発現量とそしゃく行動の関係解析

先の報告から味覚学習後に成績によってインシュリン様遺伝子 MIP II の mRNA 量が異なることが示されていた。そこで、行動レベルにおけるインシュリンによる体液性調節作用を明らかにするため、個体状態別 (飢餓、飽食、飢餓後の餌投与時)、ショ糖に対するそしゃく応答数によって個体を分け、中枢神経系内の MIP II 遺伝子発現量を測定した。

(2) そしゃく神経回路におけるインシュリンシグナル受容細胞の解析

インシュリンシグナルの下流で働く転写調節因子 Fox0 の細胞内局在は、インシュリン刺激によるリン酸化状態と一致する。本研究では、Fox0 をマーカーとして用い、そしゃく神経回路に含まれるインシュリンシグナル受容細胞の網羅的な探索を試みる。

(3) そしゃく行動に関連する特定ニューロンの生理学的応答の解析

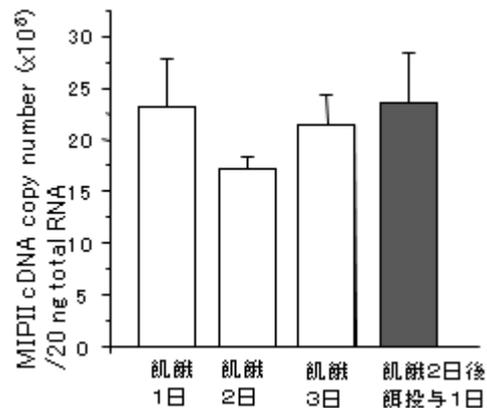
味覚学習、そしゃく行動に関わる特定ニューロンの生理学的性質について、味覚刺激投与による変化を電気生理学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系内インシュリン様遺伝子発現解析 (定量性 RT-PCR 法)

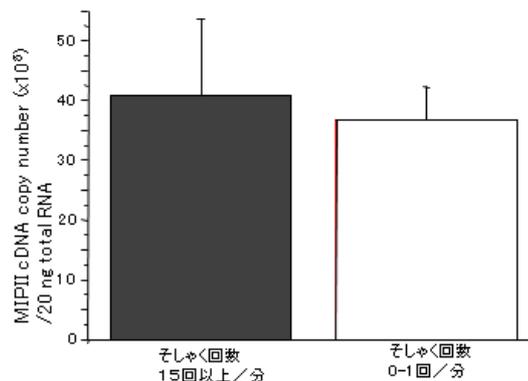
飢餓状態、飽食状態の個体から中枢神経系を取り出し、インシュリン様遺伝子 MIP II 発現量を定量性 RT-PCR により測定した。その結果、モノアラガイ MIP II の発現は 1 ~ 3 日の飢餓状態によって変化しないことがわかった (図 1)。

図 1



次にショ糖投与によるそしゃく応答と、MIP II 遺伝子発現量との関連を解析した。その結果、ショ糖投与によるそしゃく回数異なる個体群において、MIP II 遺伝子発現量は変化しないことが分かった (図 2)。

図 2



これらの結果より、1 ~ 3 日の飢餓状態や、餌の有無によって MIP II 遺伝子発現量は急激に変化しないことがわかった。また、MIP II 遺伝子発現量と、ショ糖刺激に対するそしゃく行動との関連はないことが示された。

(2) モノアラガイ中枢神経系における転写調節因子 Fox0 cDNA 配列決定

Fox0 の細胞内局在はインシュリン刺激によるリン酸化状態と一致するため、細胞応答マーカーとして用いることを計画した。転写調節因子 Fox0 アミノ酸配列は種間保存性が高いため、他種配列を基に縮重プライマーを設計し、モノアラガイ中枢神経系における Fox0 遺伝子の PCR クローニングを行った。その結果、モノアラガイ Fox0 遺伝子のクロー

ニングに成功し、予想されるアミノ酸配列は他種配列と高い保存性を示すことを確認した(図3)。

図3、Lymnaea: モノアラガイ, Drosophila: ショウジョウバエ, C.elegans: 線虫, Human: ヒト

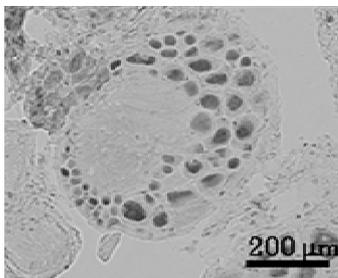
Lymnaea FOX0	51	QHGSVKDPL--GLTAKKCGSRNAWGNISYADLITKAIQSSPEKR	93
Drosophila FOX0	71	APGDSQQAIQNANAANKNISRRAWGNISYADLITKAIQSSATDKR	115
C.elegans DAF-16	120	SDFRMSESPDPTVSGKNTTIRRAWGNISYAEIITTAIAPASPEKR	164
Human FOXO1	136	PVPPAAAGPLAGPRKSSSRRAWGNISYADLITKAIQSSAEKR	180
Lymnaea FOX0	94	LTLSTQIYDMVQVVPYFDKGDSSAGWKNISIRHNLSLHNRFR	138
Drosophila FOX0	116	LTLSTQIYDMVQVVPYFDKGDSSAGWKNISIRHNLSLHNRFR	160
C.elegans DAF-16	165	LTLAQIYDMVQVVPYFDKGDSSAGWKNISIRHNLSLHNRFR	209
Human FOXO1	181	LTLSTQIYDMVQVVPYFDKGDSSAGWKNISIRHNLSLHNRFR	225
Lymnaea FOX0	139	IQNEGIGKSSMWLNPD-APGKTPRRRAGSME-TKSYEKRRGRV	181
Drosophila FOX0	161	VQNEGIGKSSMWLNPE-APGKSVRRRAASME-TSRYEKRRGRA	203
C.elegans DAF-16	210	IQNEGIGKSSMWLNPD-APGRNPRRTRENTIETTIAQLEK	253
Human FOXO1	226	VQNEGIGKSSMWLNPEGGKSGKSPRRRAASMDNNSKFAKSRRA	270

中枢神経系内 Fox0 のリン酸化・細胞内局在解析(免疫組織化学実験)

次にモノアラガイ Fox0 予測アミノ酸配列から、免疫染色実験で使用する抗体の検討を行った。哺乳類用の市販抗体で抗原部位が利用できるものを選んで免疫染色を行った。

Fox0 の細胞内局在はインシュリン刺激によるリン酸化状態と一致するため、細胞応答マーカーとして用いた。動物個体の状態(飢餓、飽食)により Fox0 の細胞内局在が異なるニューロン、インシュリン投与によりシグナルを受容したニューロンを探索した(図4)。

図4



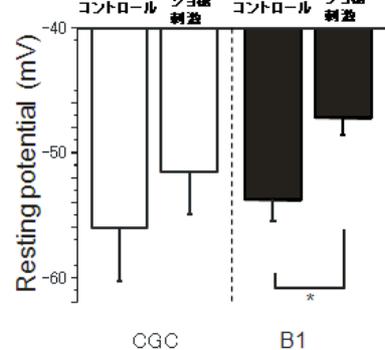
その結果、飢餓・飽食状態、インシュリン処理によって Fox0 細胞内局在が変化するニューロンの同定には至らなかった。しかしながら、そしゃく神経回路の多くのニューロンが含まれる口球神経節のニューロンは、他の神経節のニューロンに比べてインシュリンに対する Fox0 リン酸化の感度が良い傾向があることがわかった(投稿準備中)。

(3) そしゃく行動に関連する特定ニューロンの生理学的応答の解析

味覚学習、そしゃく行動に関わる特定ニューロンの生理学的性質について、味覚刺激投与による変化を電気生理学的に解析する。味覚学習において重要なセロトニン分泌ニューロン(CGC)と、唾液腺運動ニューロン(B1)に着目し、味覚学習で用いるショ糖刺激の繰

り返し投与後の各ニューロンの静止膜電位を測定した。その結果、ショ糖の繰り返し投与により、口球神経節にある B1 細胞の静止膜電位が有意に上昇し、興奮しやすい状態になることがわかった。また、介在ニューロンである CGC ではコントロールと比べて有意差はなかった(図5、研究協力者: 濱徳行)。

図5



以上の結果から、インシュリン様遺伝子発現量は数日間の飢餓・飽食によっても変化せず、体液性調節がニューロンからの分泌量調節により行われていることが示唆された。また、インシュリンや、個体へのショ糖投与によって生理学的性質が変化するニューロンは、そしゃく行動に直接的に関わる神経節中に存在することが示された。

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6件)

渡邊隆之、定本久世、青沼仁志、Identification and expression analysis of the genes involved in serotonin biosynthesis and transduction in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Insect Molecular Biology*, 掲載決定済、平成 23 年(2011)、査読有

定本久世、齋藤健太、武藤秀樹、金城政孝、伊藤悦朗、Direct Observation of Dimerization between Different CREB1 Isoforms in a Living Cell. *PLoS ONE*, Vol. 6(6), e20285、平成 23 年(2011)、査読有

定本久世、北橋隆史、藤戸裕、伊藤悦朗、Learning-Dependent Gene Expression of CREB1 Isoforms in the Molluscan Brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, Vol. 4, 25、平成 22 年(2010)、査読有

畠山大、箕田康一、小林卓、定本久世、藤戸裕、L. Hiripi, K. Elekes、伊藤悦朗、Glutamate transporters in the central nervous system of a pond snail. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 88, 1374-86、平成 22 年(2010)、査読有

定本久世、伊藤悦朗、mRNA 絶対定量法によって明らかにされた長期記憶時の転写調節因子 CREB の増減、生物物理、Vol. 51、18-21、平成 22 年 (2010) 査読有

定本久世、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、日本比較生理生化学会誌、Vol. 26 (4)、163-8、平成 22 年 (2010) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

定本久世、國友美江、伊藤悦朗、Neuronal nitric oxide synthase is the functional NOS in the central nervous system of mollusk、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)平成22年(2010)12月7日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

定本久世、國友美江、伊藤悦朗、軟体動物中枢神経系における神経型一酸化窒素合成酵素の発現分布、日本動物学会第81回東京大会、平成22年(2010)9月27日、東京大学駒場キャンパス(東京都)

定本久世、伊藤悦朗、ヨーロッパモノアラガイにおける一酸化窒素合成酵素の遺伝子発現解析、平成22年無脊椎動物研究会、平成22年(2010)9月1日、帝人富士研究所(静岡県)

定本久世、國友美江、伊藤悦朗、Neuronal nitric oxide synthase in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*、the 2010 International Congress of Neuroethology、平成 22 年 (2010) 8 月 6 日、サラマンカ(スペイン)

定本久世、伊藤悦朗、軟体動物中枢神経系における一酸化窒素合成酵素の発現解析、第 32 回日本比較生理生化学会大会、平成 22 年 (2010) 7 月 17 日、九州産業大学(福岡県)

伊藤悦朗、村上準、定本久世、岡田龍一、奥田明子、モノアラガイ中枢神経系におけるインスリン様ペプチドのはたらき、第 32 回日本比較生理生化学会大会、平成 22 年 (2010) 7 月 17 日、九州産業大学(福岡県)

伊藤悦朗、村上準、定本久世、岡田龍一、奥田明子、モノアラガイ中枢神経系におけるインスリン様ペプチドのはたらき、第 32 回日本比較生理生化学会大会、平成 22 年 (2010) 7 月 17 日、九州産業大学(福岡県)

定本久世、伊藤悦朗、軟体動物中枢神経系における一酸化窒素合成酵素の発現解析、日本生物物理学会第 2 回中国四国支部大会、平成 21 年 (2010) 5 月 8 日、松山大学(愛媛県)

定本久世、伊藤悦朗、Gene expression of neuronal nitric oxide synthase in the mollusk, *Lymnaea stagnalis*、平成 21 年

(2009)10月31日、アスティとくしま(徳島県)

定本久世、伊藤悦朗、Neuronal nitric oxide synthase in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*、北米神経科学会 2009、平成 21 年 (2009) 10 月 21 日、シカゴ(アメリカ合衆国)

定本久世、伊藤悦朗、ヨーロッパモノアラガイにおける神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の発現解析(第80回日本動物学会)、平成 21 年 (2009) 9 月 17 日、静岡グランシップ(静岡県)

定本久世、伊藤悦朗、モノアラガイにおける神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の発現解析(無脊椎動物神経研究会)、平成 21 年 (2009) 9 月 3 日、竹富町上原地区公民館(沖縄県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[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

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

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

青沼仁志 (AONUMA HITOSHI)
研究者番号：20333643

(4) 研究協力者

濱 德行 (HAMA NORIYUKI)
島根大学・医学部・助教
小林 卓 (KOBAYASHI SUGURU)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
村上 準 (MURKAMI JYUN)
徳島文理大学・香川薬学部・博士研究員
伊藤悦朗 (ITO ETSURO)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
藤戸 裕 (FUJITO YUTAKA)
札幌医科大学・医学部・準教授