

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570083

研究課題名(和文) 昆虫の連合学習に果たす一酸化窒素シグナル伝達系の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of nitric oxide action 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：コオロギを用いた研究から、ガス状の拡散性分子である一酸化窒素(NO)は、短期記憶を長期記憶へと誘導する重要な物質であることが知られている。しかしながら昆虫の記憶中枢であるキノコ体において、NOが果たしている役割は不明であった。本研究によって、NOは、キノコ体の内在ニューロンである大型ケニオン細胞によって産生され、細胞内のシグナル伝達を介して各種のイオンチャンネルタンパク質の性質を変え、膜の興奮性を上昇させるモジュレーターとしての働きがあることが示された。

研究成果の概要(英文)：Crickets have high capacity to form olfactory long-term memory. Previous studies have pointed to the importance of the nitric oxide (NO) signaling cascade in the formation of olfactory long-term memory within mushroom bodies. However, the mechanisms by which NO modulates neuronal excitability in mushroom bodies and results in the formation of LTM are not well understood. In the present study, we have revealed that NO increases the frequency and number of action potentials in Kenyon cells via modulation of various kinds of ionic channels including persistent Na, L-type Ca, Na-activated K, and BK channels. We conclude that NO acts as a modulator resulting in a stimulatory signal in Kenyon cells.

研究分野：神経生理学

キーワード：キノコ体 ケニオン細胞 イオンチャンネル 一酸化窒素 cGMP 嗅覚連合学習

1. 研究開始当初の背景

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 Matsumotoら (2009) は一酸化窒素 (NO) /cGMPシグナル伝達系が短期記憶を長期記憶へと移行させる際の「スイッチ」役として働くことを示し、その分子機構に関する仮説を提唱した。個体レベルで得られたこの知見は、脊椎動物との共通性を示しており、フタホシコオロギが記憶の分子機構を解明する有用なモデル動物であることを示唆している。

本研究は上記の仮説を基に、キノコ体から解離した単一ケニオン細胞を用いて NOシグナルの標的となるイオンチャネル蛋白質の電気生理学的応答を指標に、主にNOの下流の細胞内シグナル伝達の実体を明らかにし長期記憶形成の分子機構を解明しようとするものである。

2. 研究の目的

NOの上流に代謝型アセチルコリン (ACh) 受容体の関与のあることをすでに明らかにしている。AChは、PLC/IP<sub>3</sub>、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出、Ca/CaM-CaMKII、一酸化窒素合成酵素の活性化という一連のシグナル伝達経路を介して大型ケニオン細胞により産生される可能性を既に示唆した。本研究は、NOの下流に想定されるsGC/cGMP/PKGシグナル伝達による各種イオンチャネルのリン酸化による修飾機構、及びNOの自発性活動電位及び誘発性活動電位に対する作用を明らかにし、複数回の条件付け刺激による短期記憶から長期記憶への移行過程でNOシグナル伝達系が果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

イオンチャネルや受容体に対するNO作用を明らかにするためには、細胞内のシグナル伝達に参与する細胞内因子が温存されている必要がある。その為、本研究では、細胞内調節因子の流出を回避できるβエスシンを用いた穿孔パッチクランプ法と単一チャネル記録の基本モードであるCell-attached patch clamp法を用いた。

4. 研究成果

(1)NOの下流に存在するシグナル伝達経路を、同定イオンチャネルの活動を指標にシグナル伝達特異的阻害剤を用い、電気薬理的に調査し、以下の点を明らかにした。

- ① Na<sup>+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネルの活動はNO供与剤であるGSNO及びSNAPにより抑制される。この抑制作用は可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害剤ODQ、及びcGMP依存性プロテインキナーゼ (PKG) 抑制剤KT5823により抑制された (図1)。膜透過型cGMPアナログである8-Bromo cGMPはNO作用を模倣した。

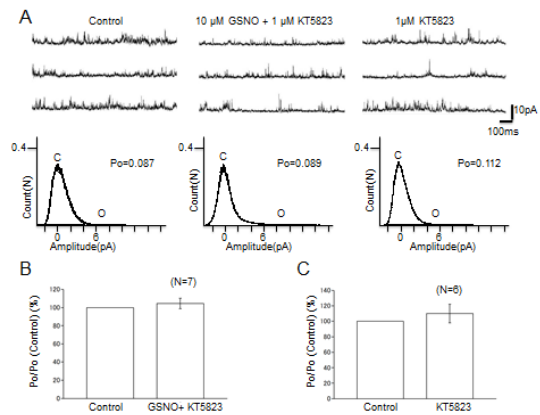


図1 Na<sup>+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル電流のNO作用に対するPKG抑制剤KT5823の作用

- ②単一の電位依存性L型Ca<sup>2+</sup>チャネルの活動はGSNO及びSNAPにより増強された。この増強作用はODQ及びKT5823により抑制された (図2)。8-Bromo cGMPはNO作用を模倣した。

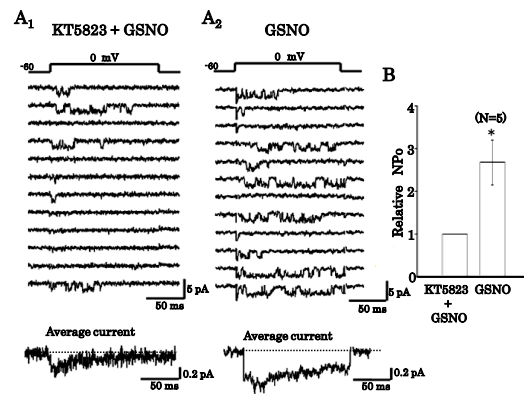


図2 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流のNO作用に対するPKG抑制剤KT5823の作用

- ③ TTX感受性で活性化及び不活性化の早い一過性Na<sup>+</sup>チャネル電流とTTX感受性かつ低濃度Cd<sup>2+</sup>感受性で不活性化の遅い持続性Na<sup>+</sup>チャネル電流はGSNO及びSNAPにより共に増強された (図3)。この増強作用はODQ及びKT5823により抑制された。8-Bromo cGMPはNO作用を模倣した。

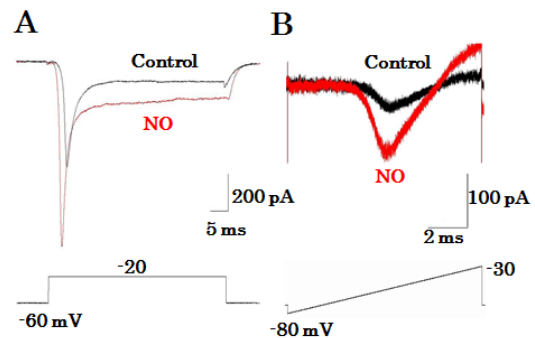


図3 Na<sup>+</sup>電流に対するNOの作用

(2) ケニオン細胞の  $Ca^{2+}$  チャンネルと BK チャンネルが機能連関していることを明らかにした。BK 電流は  $Ca^{2+}$  チャンネルを外液  $Ca^{2+}$ -free もしくは Verapamil でブロックすると抑制された (図 4)。

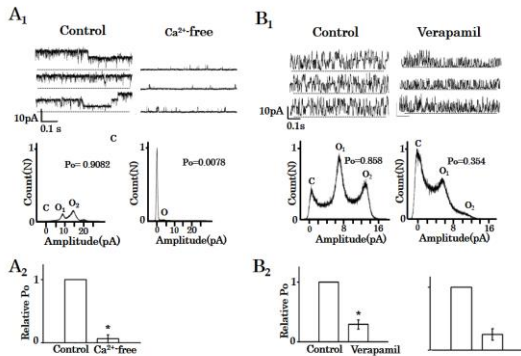


図 4 BK チャンネル電流に対する  $Ca^{2+}$ -free 及び Verapamil の作用

(3) ケニオン細胞の持続性  $Na^+$  チャンネルと  $Na^+$  活性化  $K^+$  チャンネルが機能連関していることを明らかにした。 $Na^+$  活性化  $K^+$  電流は持続性  $Na^+$  チャンネルを高濃度 TTX ( $1 \mu M$ ) や低濃度  $Cd^{2+}$  ( $50 \mu M$ ) でブロックすると抑制された (図 5)。

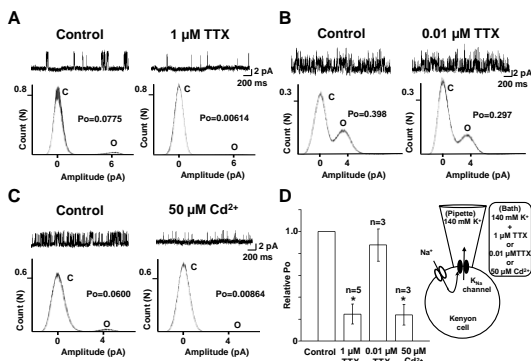


図 5  $Na^+$  活性化  $K^+$  チャンネル電流に対する TTX 及び  $Cd^{2+}$  の作用

(4) NO の各イオンチャンネルに対する作用をまとめて図示した (図 6)

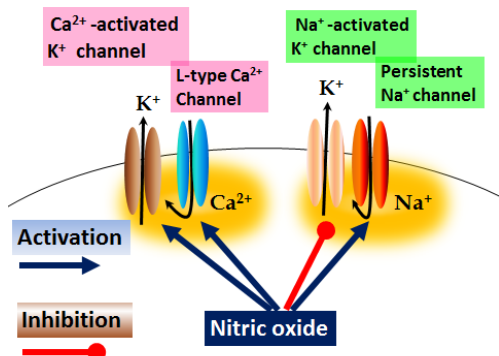


図 6 NO の各イオンチャンネルに対する作用

(5) 膜興奮性に対する NO の影響を明らかにするため、ケニオン細胞の自発性及び誘発性活動電位に対する作用を調査し、以下の点を明らかにした

① NO はケニオン細胞の自発性活動電位の発火頻度及び発火数を増強した (図 7)。

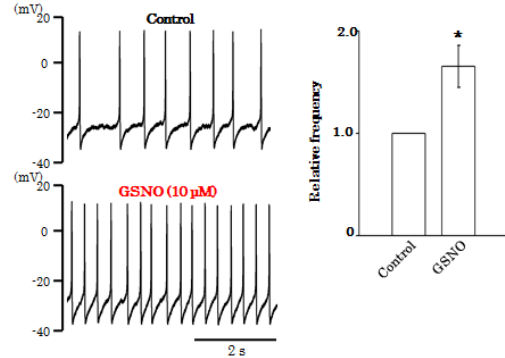


図 7 自発性活動電位に対する NO の作用

② NO はケニオン細胞の誘発性活動電位の発火頻度及び発火数を増強した (図 8)。

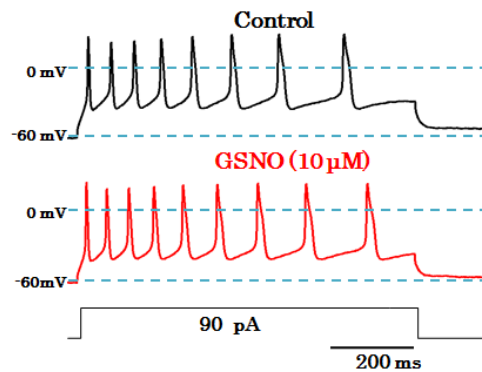


図 8 誘発性活動電位に対する NO の作用

③ NO は誘発性活動電位の立ち上がり速度 (Rate of rise) 及び振幅を増大し、スパイク間距離を短縮して発火頻度を増大する。また後過分極電位を増大する (図 9)。これらの作用は図 6 に示した NO の各イオンチャンネルに対する作用によって説明できる。

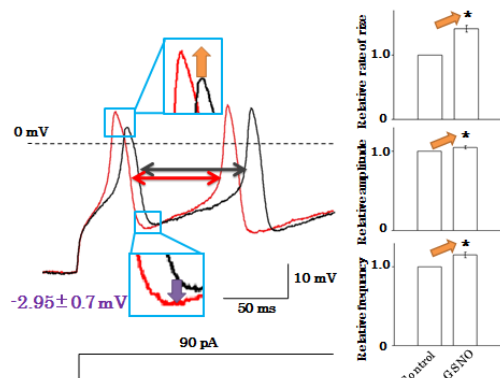


図 9 誘発性活動電位の立ち上がり速度、振幅、後過分極電位に対する NO の作用

(6) 本研究による成果を基に NO の嗅覚連合学習に果たす機能的役割について考察し、以下に示す仮説をたてた (図 10)。

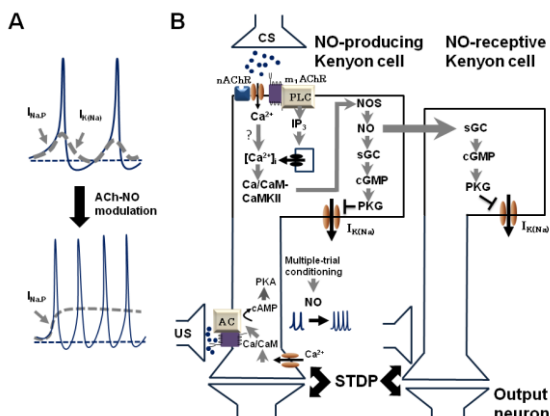


図 10 連合学習に果たす NO シグナル伝達系の役割に関する仮説

A: 持続性  $\text{Na}^+$ 電流 ( $I_{\text{NaP}}$ ) と  $\text{Na}^+$ 活性化  $\text{K}^+$ 電流 ( $I_{\text{KNa}}$ ) は連動して膜電位のオシレーションを発生する。ACh-NO シグナル伝達によって  $I_{\text{NaP}}$  が増大し  $I_{\text{KNa}}$  が抑制されると  $\text{Na}^+$ チャンネルと  $\text{Na}^+$ 活性化  $\text{K}^+$ チャンネル間の機能連関がアンカップリングし、オシレーションが消失して膜の持続的脱分極が発生する。これによって、膜の興奮性が上昇し、活動電位の発火頻度が上昇する。B: 複数回の条件付けによって、大型ケニオン細胞 (NO-producing Kenyon cell) から、イオンチャネル型 (nAChR) 及び代謝型アセチルコリン受容体 ( $m_1$ AChR) の活性化を介して産生される。この過程には、PLC/ $\text{IP}_3$ 、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出、Ca/CaM-CaMKII、一酸化窒素合成酵素の活性化という一連の細胞内シグナル伝達経路が関与している。産生された NO は大型ケニオン細胞内で作用すると同時に周辺のケニオン細胞 (NO-receptive Kenyon cell) に拡散し、sGC/cGMP/PKG の活性化を介して各種イオンチャネルを協調的に修飾し、膜の興奮性を上昇させる正の興奮性メディエーターとして作用する。

複数回の条件刺激 (CS) を行う過程で、NO が産生される。NO はシナプス入力部域で発生する活動電位の発火頻度及び発火数を増加し peduncle を伝導した活動電位列は、出力シナプス部域へ到達する。ケニオン細胞の活動電位の発火頻度及び発火数の上昇はケニオン細胞と、出力ニューロン間のシナプス伝達効率を、STDP (Spike-Timing-Dependent synaptic Plasticity: スパイク時刻依存シナプス可塑性) 機構を介して増強すると考えられる。報酬や罰情報を伝える無条件刺激 (US) は、STDP で標識されたシナプス部位に作用し、そこで連合が成立する。

この連合過程では、アデニル酸シクラーゼ (AC) が、同時生起検出器として働き、ケニオン細胞の出力部位に到達した複数の活動電位列による  $\text{Ca}^{2+}$ 流入、Ca/CaM による AC 活性化と、無条件刺激 (US) による G 蛋白質カップリングによる AC 活性化の両者により cAMP/PKA 活性が高まる。PKA は CREB タンパク質をリン酸化し新規タンパク質の合成が開始される。

## 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 5 件)

- ① Kumiko Kosakai, Yuuki Tsujiuchi, Masami Yoshino, Nitric oxide augments single  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents via cGMP-dependent protein kinase in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 78, 2015, pp. 26-32  
DOI:10.1016/j.jinsphys.2015.04.009
- ② Hirotake Tamashiro, Masami Yoshino, Involvement of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels,  $\text{IP}_3$  receptors, and ryanodine receptors in the generation of spontaneous rhythmic contractions of the cricket lateral oviduct, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 71, 2014, pp. 97-104  
DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.10.004
- ③ Hirotake Tamashiro, Masami Yoshino, Signaling pathway underlying the octopaminergic modulation of myogenic contraction in the cricket lateral oviduct, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 71, 2014, pp. 30-36  
DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.09.010
- ④ Shigeki Inoue, Kaoru Murata, Aiko Tanaka, Eri Kakuta, Saori Tanemura, Shiori Hatakeyama, Atunao Nakamura, Chihiro Yamamoto, Masaharu Hasebe, Kumiko Kosakai, Masami Yoshino, Ionic channel mechanisms mediating the intrinsic excitability of Kenyon cells in the mushroom body of the cricket brain, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 68, 2014, pp. 48-57  
DOI:10.1016/j.jinsphys.2014.06.013
- ⑤ Atsunao Nakamura, Masami Yoshino, A novel GABAergic action mediated by functional coupling between  $\text{GABA}_B$ -like receptor and two different high-conductance  $\text{K}^+$  channels in cricket Kenyon cells, *Journal of Neurophysiology*, 査読有, Vol. 109, 2013, pp. 1735-1745  
DOI:10.1152/jn.00915.2012

[学会発表] (計 16 件)

- ① 深津海斗、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する電位依存性  $\text{Na}^+$ チャンネルに対する一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・生命医科学センター (東京)
- ② 古市達樹、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に見られる活動電位のイオン機構と一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・生命医科学セン

ター (東京)

- ③ 石丸祐基、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する BK チャネルのムスカリン性受容体による制御、日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・生命医科学センター (東京)
- ④ 高橋泉、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する巨大コンダクタンス Na 活性化 K<sup>+</sup>チャネルと TTX 感受性持続性 Na<sup>+</sup>電流の機能連関、日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・生命医科学センター (東京)
- ⑤ 小境久美子、吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に発現する電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルの性質と一酸化窒素シグナル伝達系の作用、日本動物学会第 67 回関東支部大会、2015 年 3 月 14 日、早稲田大学・生命医科学センター (東京)
- ⑥ 高橋泉、石丸祐基、中村敦直、田中藍子、吉野正巳、フタホシコオロギケニオン細胞に見出された電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルと Na<sup>+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネルの機能連関、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11-13 日、東北大学川内北キャンパス (仙台)
- ⑦ 深津海斗、古市達樹、池田真理子、石丸祐基、吉野正巳、ケニオン細胞の Na<sup>+</sup>チャネルに対する一酸化窒素 (NO) の作用、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11-13 日、東北大学川内北キャンパス (仙台)
- ⑧ 吉野正巳、昆虫の記憶中枢ニューロンに見出された持続性 Na 電流の性質、日本生理学会第 91 回大会、2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島)
- ⑨ Yoshino M、Intrinsic membrane properties of acutely dissociated Kenyon cells and their modulation by nitric oxide signaling pathway、11<sup>th</sup> International Congress of Neuroethology、2014CN/JSCVPB、July 31、Sapporo Convention Center (Sapporo)
- ⑩ Yoshino M、Intrinsic membrane properties of acutely dissociated Kenyon cells and their modulation by nitric oxide signaling pathway、HNW2014、Hokkaido Neuroethology Workshops、2014 Satellite to 2014 ICN/JSCPB、July 27、Hokkaido University Sapporo Campus (Sapporo)
- ⑪ 吉野正巳、コオロギのケニオン細胞に見られる NO シグナル伝達系の膜興奮変容作用、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26-28 日、岡山大学津島キャンパス (岡

山)

- ⑫ 中村敦直、吉野正巳、2 種の巨大コンダクタンス K<sup>+</sup>チャネルとリンクした新規の GABA 抑制様式の発見、日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京)
- ⑬ 田中藍子、吉野正巳、巨大コンダクタンス Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネルと電位依存性 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの機能連関、日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京)
- ⑭ 玉城弘健、吉野正巳、コオロギの側輸卵管に見られる筋原性リズム収縮とオクトパミンによる変調作用の解明、日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京)
- ⑮ 大矢崇之、吉野正巳、コオロギの側輸卵管単一細胞に見られる自動能の解析、日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東京工業大学大岡山キャンパス(東京)
- ⑯ 吉野正巳、中村敦直、昆虫の高次脳記憶中枢ニューロンに見られる GABA<sub>B</sub> 受容体と巨大コンダクタンスカリウムチャネル 2 種との機能結合、日本生理学会第 90 回大会、2013 年 3 月 27-29 日、タワーホール船堀 (東京)

## 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