

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657055

研究課題名(和文)学習による脳内単一神経細胞内でのcAMP濃度上昇の測定

研究課題名(英文)Measurement of cAMP concentration in a single neuron associated with learning

研究代表者

伊藤 悦朗(Ito, Etsuro)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：80203131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：学習時にシナプス前細胞内でcAMP濃度が上昇するものと仮定されている。しかし、実際にcAMP濃度が上昇するのは、これまでわかっていなかったで、モノアラガイ単一神経細胞を用いて検証することを目的とした。測定方法としては、cAMPセンサータンパク質によるイメージング法ならびにcAMPの抗体による超高感度ELISA法を用いた。イメージング法は残念ながら成功しなかった。一方、ELISA法については細胞内のcAMP濃度は $10^{-8}$  mol/cellくらいが定量できれば十分なはずであることがわかり、実際に今回のチャンピオンデータとしては、単一ニューロンでのcAMPは可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：It has been hypothesized that cAMP concentration would be increased in a presynaptic neuron in the brain during the learning process. However, nobody has succeeded in measuring this cAMP concentration in a single neuron. To address this issue, we attempted to develop the measurement system in the key single neuron of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. When we applied the super-sensitive measurement method by combination of an ELISA method and an enzymatic cycling method, we clarified that the cAMP concentration can be measured in a single neuron. We should continue to examine the change in this cAMP concentration in a single neuron in the brain by a learning procedure.

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：学習 記憶 環状アデノシンーリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、脳の構造が簡単で神経細胞の数が少なく、しかし、脳高次機能の研究に最適な動物である軟体動物腹足類のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を用いて、その脳高次機能変化の一つである「学習記憶機構」について研究を続けてきている。モノアラガイでは、学習記憶機構の鍵を握るキー・ニューロン (Cerebral Giant Cell: CGC) を以前に同定している。この CGC 単一神経細胞をシナプス前細胞として、それに続くそしゃく運動を司る CPG (central pattern generator) の神経細胞をシナプス後細胞とした回路で、シナプスの長期変化が起こることがわかった。そこでわれわれは多くの動物で示されている通り、学習時にシナプス前細胞内で cAMP 濃度が上昇するものと仮定した。実際に軟体動物腹足類でも、「脳全体」では cAMP 濃度が上昇していることがわかっている。

学習記憶機構を人為的にミミックするために、このシナプス前側の CGC 単一神経細胞内で cAMP 濃度を人為的に上昇させてみた。その結果、A キナーゼが活性化し、ひいては転写因子 cAMP response element binding protein (CREB1、転写促進型) の活性化が起こり、結果として、学習記憶の生理学的応答を再現できることがわかった。また、われわれは細胞 1 個中の mRNA の定量方法の開発に成功しており、実際に CGC 単一神経細胞 1 個において、CREB1 に加えて CREB2 (転写抑制型) の mRNA を定量することができた。しかもそれらの mRNA 量は学習によって変動することも示された。しかしながら、本研究者らを含めて世界中の研究者が、学習記憶機構を人為的にミミックするために、シナプス前細胞内で cAMP 濃度を人為的に上昇させているが、本当に学習に伴ってこのシナプス前細胞で cAMP 濃度が上昇するのかが、誰も示すことができていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

「学習時に脳内の単一神経細胞内で cAMP 濃度は本当に上昇するのか？」この問題をモノアラガイ単一神経細胞を用いて検証することを目的とした。

実験動物としてモノアラガイを使うところに大きな特色がある。モノアラガイは個体行動の変容が観察でき、その上で脳内の単一神経細胞からのデータ収集が可能である。つまり、モノアラガイを使えば、学習に伴う行動変容と脳内の単一神経細胞内 cAMP 濃度の上昇とを合わせて記録できる。学習に伴う cAMP の濃度上昇を、脳内の単一神経細胞内で測定した論文はこれまでにない。また、この方法が確立できれば、脳神経科学分野のみならず、発生学、内分泌学や免疫学など、cAMP のシグナルトランスダクション経路が重要視されている分野で、すぐに応用可能

であることに、重要な意義がある。

これまでに学習・記憶研究においても、ラジオアイソトープを使った脳全体での cAMP 濃度上昇は記録しているが、学習時に研究者が標的としている脳内の単一神経細胞内で cAMP 濃度が本当に上昇しているのかが、誰も示せていない。われわれの研究が成功すれば、神経情報伝達解析のための新たなツールが提出されることになり、その学問的または経済的效果は大きいと考える。

## 3. 研究の方法

研究の方法は次の 2 種類を試みた。

(1) cAMP センサータンパク質によるイメージング法の適用

cAMP センサータンパク質である Epac1-camps を、モノアラガイの学習記憶に強く関与する単一神経細胞に導入し、その神経細胞内の cAMP 濃度を定量測定できるように、システムの開発を試みた。この Epac1-camps は慶應義塾大学の岡浩太郎教授より譲渡いただいた。

Epac1-camps は FRET を利用したイメージング実験である。そして単離脳標本を用いた学習成立時に、cAMP が本当に単一神経細胞内で上昇することを証明しようとした。

はじめに、モノアラガイの単一神経細胞に発現ベクターを導入して発現させるのか、または、タンパク質を人工的に発現させておいて、それを細胞に導入し、高感度で微量検出できるように、イメージング装置を改良して行くのか、このどちらの方法で研究を進めるのかを決めた。

(2) cAMP 抗体による超高感度 ELISA 法の適用

cAMP を超高感度でかつ定量性を出すための測定法として、「ELISA 法のサンドイッチ法」を適用することも考えた。この ELISA で得られる値をさらに高感度にするに、「酵素サイクリング法」という基質の増幅法を組み合わせさせた。そこで、本研究では、「ELISA 法と酵素サイクリング法とを組み合わせる」ことによって、超高感度での定量化を達成しようとした。成果のところ、この方法についての詳細を説明する。

## 4. 研究成果

(1) cAMP センサータンパク質によるイメージング法の適用

最初に、発現ベクターをモノアラガイの単一神経細胞に導入して発現させる実験は、いろいろと条件を変えて試してみたものの成功しなかった。

次に、Epac1-camps を大腸菌で発現させるための至適条件の検討を行い、これを決定した。そして、大腸菌をソニケーション破砕した上清から Epac1-campus を精製し、それが cAMP センサータンパク質として機能することを確認した。

予想通り cAMP が結合していないときは FRET が起こり YFP の蛍光強度が強い。しかし cAMP が結合すると、YFP の蛍光強度が小さくなることを確認された。すなわち CFP と YFP の強度比の変化が cAMP の濃度依存的に変化することが確認された (図 1 参照)。これは in vitro では、大腸菌で発現・精製した Epac1-campus が、十分に cAMP を計測可能であることを示している。

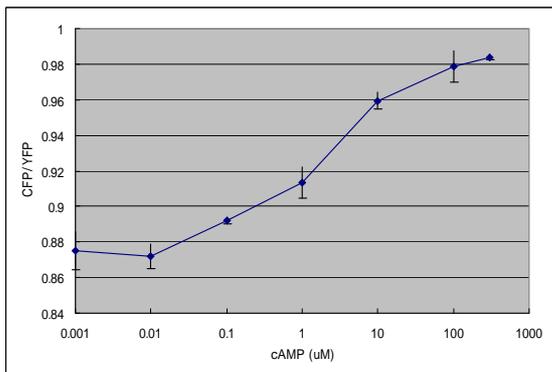


図 1 .cAMP の濃度依存的に変化する蛍光強度比 (CFP/YFP)

次に、モノアラガイの味覚嫌悪学習で重要な役割を果たすしゃく運動に関する介在ニューロン (CGC) に対して、発現タンパク質の Epac1-camps を注入した。この場合の標本は単離脳であり、現在はこの単離脳にフォルスコリンを作用させて cAMP 濃度を上昇させた場合を計測してみた。

しかし、この発現タンパク質をニューロン内に注入して cAMP を測定する実験もいろいろと条件を変えて試みたが、成功しなかった。

そこで、測定方法を次の ELISA 法に変えた。

#### (2) cAMP 抗体による超高感度 ELISA 法の適用

まずは極微量の cAMP を、しかもたった 1 つの細胞内で測定するための測定方法の開発を手掛けた。

ELISA 法は反応時間に対して得られるシグナルは線形である。また同じく、酵素サイクリング法も線形である。しかし、図 2 に示すように、これら 2 つを組み合わせると、反応時間に対してシグナルは 2 次関数的に急激に変化することになり、すなわち超高感度化が望める。

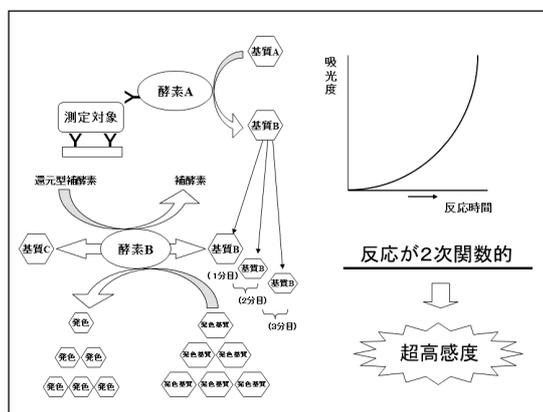


図 2 . ELISA 法と酵素サイクリング法とを組み合わせた超高感度測定法の原理

測定の基本は ELISA 法であるので、抗原抗体反応を用いている。つまり特異的な抗体が必要である。本来、ハプテンである cAMP は抗体の作製が困難であるが、最近、抗体メーカー数社から cAMP に対する優れた抗体が市販されており (アブカム社)、しかもこれが ATP などには反応しないことがわかっているので利用した。また本研究者は、この抗体を用いて、免疫組織化学実験も成功している。

そこで、ELISA 系と酵素サイクリング系の両方の相互干渉など、全体的な最適条件を決定する必要があった。すなわちどのような pH やどのような温度が測定にとって最適であるのか等、その調整に時間を要した。本研究者らの方法は超高感度であるから、抗体等になにか別の酵素や基質が極微量でも含まれていると、それが結果に大きく作用する。つまりこのようなコンタミがあった場合の除去についても、われわれは慎重に対応しなければならなかった。

その結果、次の成果を得た。細胞内の cAMP 濃度は、一般的にはベースレベルで  $10^{-9}$  mol/L くらいだと見積もられていたため、1 つの細胞あたりだと  $10^{-18}$  mol/cell くらいの cAMP の個数が定量できれば十分なはずである。本研究者の方法では  $10^{-20}$  mol/cell が定量限界であるので cAMP は測定できると見込んだ。実際に、チャンピオンデータとしては、単一ニューロンでの cAMP は可能であることが分かった。しかしながら、その再現性 (つまり CV 値) などについて、今後まだ検証を続ける必要があり、かつ、実際に学習時に cAMP 濃度が単一ニューロンで上昇するのは、今後の検討が必要となった。今後、必ずこの方法を用いて研究を成功させたい。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 15 件)

E. Ito, R. Okada, Y. Sakamoto, E. Otshuka, K. Mita, A. Okuta, H. Sunada and M. Sakakibara: Insulin and memory in *Lymnaea*. *Acta Biol Hung*, 63: 320-327 (2012) 査読有

R.Matsuo, M.Yamagishi and E.Ito: Analyses of DNA endoreplication in the brain neurons in the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Acta Biol Hung*, 63: 297-304 (2012) 査読有

S.Kobayashi and E.Ito: GABAergic effects on the slow oscillatory neural activities in the procerebrum of *Limax valentianus*. *Acta Biol Hung*, 63: 217-221 (2012) 査読有

S.Kobayashi, R.Matsuo, H.Sadamoto, S.Watanabe and E.Ito: Excitatory effects of GABA on procerebrum neurons in a slug. *J. Neurophysiol.*, 108: 989-998 (2012) 査読有

M.Yamagishi, E.Ito and R.Matsuo: Whole genome amplification in large neurons of the terrestrial slug *Limax*. *J. Neurochem.*, 122: 727-737 (2012) 査読有

E.Ito, E.Otsuka, N.Hama, H.Aonuma, R.Okada, D.Hatakeyama, Y.Fujito, S.Kobayashi: Memory trace in feeding neural circuitry underlying conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *PLoS ONE*, 7: e43151 (2012) 査読有

K.Elekes, I.Battonyai, S.Kobayashi and E.Ito: Organization of the procerebrum in terrestrial pulmonates (*Helix*, *Limax*) reconsidered: Cell mass layer synaptology and its serotonergic input system. *Brain Struct. Funct.*, 218: 477-490 (2013) 査読有

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 and 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) 査読有

E.Ito, S.Kojima, K.Lukowiak and M.Sakakibara: From likes to dislikes: conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Can. J. Zool.*, 91: 405-412 (2013) 査読有

J.Murakami, R.Okada, Y.Fujito, M.Sakakibara, K.Lukowiak and E.Ito: Paired pulse ratio analysis of insulin-induced synaptic plasticity in the snail brain. *J. Exp. Biol.*, 216: 1771-1773 (2013) 査読有

D.Hatakeyama, A.Okuta, E.Otsuka, K.Lukowiak and E.Ito: Consolidation of long-term memory by insulin in *Lymnaea* is not brought about by changing the number of insulin receptors. *Commun. Integr. Biol.*, 6: e23955 (2013) 査読有

E.Ito, R.Matsuo, R.Okada: Involvement of nitric oxide in memory formation in microbrains. *Neurosci. Lett.*, 541: 1-3 (2013) 査読有

R.Matsuo, M.Yamagishi, K.Wakiya, Y.Tanaka and E.Ito: Target innervation is necessary for neuronal polyploidization in the terrestrial slug *Limax*. *Dev. Neurobiol.*, 73: 609-620 (2013) 査読有

E.Otsuka, M.Matsunaga, R.Okada, M.Yamagishi, A.Okuta, K.Lukowiak and E.Ito: Increase in cyclic AMP concentration in a cerebral giant interneuron mimics part of a memory trace for conditioned taste aversion of the pond snail. *BIOPHYSICS*, 9: 161-166 (2013) 査読有

K.Mita, A.Okuta, R.Okada, D.Hatakeyama, E.Otsuka, M.Yamagishi, M.Morikawa, Y.Naganuma, Y.Fujito, V.Dyakonova, K.Lukowiak and E.Ito: What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiol. Learn. Mem.*, 107: 1-12 (2014) 査読有

〔図書〕(計4件)

伊藤悦朗：アメフラシの学習メカニズム、高校「生物」指導資料(東京書籍,東京)(2013)

岡田龍一、伊藤悦朗：脳はどこまでわかってきたか：神経可塑性に着目して、パリテイ、28(4): 24-32 (2013)

伊藤悦朗：モノアラガイ、行動生物学辞典(東京化学同人、東京)(2013)

【翻訳】ラリー・R・スクワイア、エリック・R・カンドル著、訳者 伊藤悦朗、桐野豊、小西史朗、宋時栄：記憶のしくみ 上下巻、講談社ブルーバックス(講談社、東京)(2013)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph/index-7.htm>  
|

## 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