

平成28年4月18日

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 : 700 千円	
研究代表者 : 中町 智哉	所属 : 理工学研究部 (理学) 生物学科	職位 : 助教
研究題目 : ゼブラフィッシュを用いた神経ペプチドPACAPの記憶学習行動制御機構の解析		

【研究概要】

神経ペプチドである下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) は脊椎動物種間でアミノ酸配列が高度に保存されていることから、生命活動に重要な役割を持つと考えられている。我々は哺乳類より脳の構造は単純であるが、本能行動や基本的な記憶学習に関する機構が備わっているゼブラフィッシュを用い、記憶学習機構における PACAP の役割を明らかにすることを目的として研究を進めている。ゼブラフィッシュの PACAP および PACAP 受容体 mRNA の組織発現をリアルタイム PCR 法により定量化したところ、脳内、特に記憶学習に関わることが知られている終脳と小脳で高発現していることが確認された。さらに PACAP の記憶学習行動における役割を明らかにすることを目的として、Y 字迷路水槽を用いた魚類の記憶学習法を確立した。

【成果要約】

1) ゼブラフィッシュにおける PACAP および PACAP 受容体(PAC1R) mRNA の組織発現

ゼブラフィッシュには 2 つの PACAP 遺伝子 (*adcyap1a*, *adcyap1b*) と 2 つの PAC1R 遺伝子 (*adcyap1r1a*, *adcyap1r1b*) が存在しているが、その組織分布についてはほとんど明らかになっていない。そこでリアルタイム PCR 法を用いてゼブラフィッシュにおける PACAP および PAC1R 遺伝子の各組織 (脳、鰓、皮膚、筋肉、肝臓、腸管、心臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣) における発現を定量化した。その結果、*adcyap1a* mRNA は脳、腸管、精巣において高い発現が確認されたが、*adcyap1b* mRNA は脳において高発現していることが確認された。*adcyap1r1a* および *adcyap1r1b* mRNA は脳において高発現していた。そこで、脳の領域毎の発現量を調べる為、脳を 6 か所 (終脳、間脳、視蓋、中脳、小脳、延髄) に分け、PACAP および PAC1R mRNA をそれぞれ定量した。その結果、*adcyap1a* mRNA は中脳、次いで間脳に、*adcyap1b* mRNA は終脳、次いで間脳に高発現していることが確認された。一方、*adcyap1r1a* mRNA は終脳、次いで間

脳に、*adcyp1r1b* mRNA は小脳、次いで間脳に高発現していた。PACAP および PAC1R mRNA が高発現していた終脳や小脳は記憶学習に関わる脳領域であることが知られている。また、間脳領域は本能行動の中核であることが知られている。以上の結果は、2種のPACAPが異なる組織分布を示し、さらに記憶学習や本能行動に関与する可能性を示している。今後は2種のPACAPが記憶学習や本能行動にどのように影響を与えるのかを明らかにしていく予定である。

2) Y字迷路水槽によるゼブラフィッシュの記憶学習行動評価系の確立

これまでに短期の空間記憶を評価するためのY字迷路を用いた実験系を確立した。ゼブラフィッシュを一つのアームが閉じた状態のY字型迷路に入れ、空いている2つのアームを5分間自由に探索させる。その後アームを開けて3つのアームを自由に探索させると、新奇のアームを認識してより長時間探索行動を示す（滞在時間が増加する）性質を利用した評価試験である。この手法により、正常なゼブラフィッシュを用いて行動解析した結果、有意に新規アームへの滞在時間が増加した。この行動は記憶学習を阻害することが知られているNMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストであるMK-801またはムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンの曝露により抑制されたことから、記憶学習に関連した行動であることが示唆された。今後、PACAP投与による記憶学習行動への影響に関して実験を進展する予定である。

(別添資料)

研究成果 発表状況	【雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ, 産業財産権 (特許権等) の出願・取得状況について記入】 学会発表 ・ PACAP 遺伝子欠損マウスにおける加齢に伴う学習記憶障害 中町智哉, 松田恒平, 塩田清二 日本動物学会第 86 回大会 (新潟) ・ PACAP 遺伝子欠損マウスの学習・記憶行動の評価 中町智哉, 松田恒平, 塩田清二 第 6 回ペプチドホルモン研究会 (石川) ・ Impairment of memory and learning and hippocampal oxidative damage in aged PACAP deficient mouse Nakamachi, T., Matsuda, K., and Shioda, S. CompBiol 2015 (広島)		
経費の 執行状況	区分	執行額 (円)	備考
	電気刺激切替ユニット	138,510 円	記憶学習装置部品
	実験試薬・消耗品等	400,910 円	
	学会発表等出張	160,580 円	日本動物学会第 86 回大会 第 6 回ペプチドホルモン研究会 第 40 回日本比較内分泌学会大会 (CompBiol 2015)