

論文の内容の要旨

論文題目「モデル動物における連合学習神経基盤の研究」

学位申請者 滝上 慧

キーワード：ヨーロッパモノアラガイ、味覚嫌悪条件づけ、学習・記憶、
電気刺激、条件づけ自動化装置

学習・記憶の神経機構を探るモデル動物として、条件づけの可能な軟体動物腹足類がよく用いられる。脊椎動物は個々のニューロンの特性変化を分子レベルで調べるのが困難なことから、このような研究に有用な実験動物として軟体動物腹足類が利用される。本研究では、研究実績があり、行動に関わる神経細胞、神経回路がよく研究されているヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*: 以下モノアラガイ) を対象として、条件づけによる神経系の調節機構を行動学的手法により解析し、その特徴を明らかにした。

モノアラガイは古典的条件づけの一つである味覚嫌悪条件づけが可能で、条件刺激 (CS) のショ糖と、無条件刺激 (US) の忌避刺激を組刺激として、繰り返し提示することで学習を獲得する。本論文ではまず効率的な学習獲得のための実験条件を検討した。

神経細胞において、記憶形成のために必要なプロセスの分子機構の違いから、記憶を短期記憶 (STM)、中期記憶 (ITM)、長期記憶 (LTM) と分類する作業仮説が想定されている。数分間持続する STM は既存の膜タンパク質の修飾、2~3 時間持続する ITM は新規なタンパク質合成が必要とされる。より長期間持続する LTM は、新規なタンパク質合成に加えて、遺伝子発現の変化も必要とされている。味覚嫌悪条件づけにおける記憶テストは、条件づけ前後に提示される CS に対する咀嚼行動の変化を指標とした。STM、LTM は、それぞれ条件づけ 10 分後、24 時間後の咀嚼回数により判断し、条件づけ前の CS 提示と比較して咀嚼回数が統計的に有意に減少した場合、記憶が形成されたとした。

まず味覚嫌悪条件づけによる記憶形成における C キナーゼの関与、温度依存性、時間依存性について検討した。C キナーゼの関与を調べるため、本研究では C キナーゼの活性化促進剤ブライオスタチンと、その阻害剤 Ro-32 を用いた。これまでの検討結果、CS をショ糖、US を頭部に加える機械的刺激としたとき、20 回の組刺激提示で STM、LTM が形成される。このような組刺激を用い、予めブライオスタチン処理により C キナーゼを活性化して条件づけを行うと、10 回の組刺激提示によっても効率よく学習を獲得し、記憶が成立した。ところが組刺激提示前、あるいはブライオスタチン処理以前に Ro-32 処理を行うと学習獲得、記憶形成の促進効果は観察されなかった。さらに C キナーゼ活性化による学習獲得の促進効果は、ブライオスタチン処理のタイミングには依存しなかった。

細胞内での化学反応は温度依存的であるため、学習獲得、記憶形成に関わるリン酸化、メチル化反応も温度の影響が予測される。これまで、ショウジョウバエ、ナメクジの学習

が周囲温度の 5°C 程度までの低下により阻害されるとの報告がある。これら陸棲の動物に比べ、水棲のモノアラガイでは飼育水の温度調節は容易なため、その瞬間的冷却の効果が観察できる。条件づけ後、様々な遅れ時間でモノアラガイの記憶の冷却阻害効果を観察したところ、条件づけ直後あるいは 3 時間後に 20°C から 5°C に急速冷却すると STM、LTM は形成されなかった。一方、4、7 分の遅れ時間で冷却すると STM は形成されるものの LTM 形成は阻害され、10、15 分遅れでは冷却しても記憶の阻害効果はなかった。

獲得した学習が記憶として定着するためには、それに関与する神経細胞において、リン酸化、タンパク質新生、遺伝子発現変化などに要する時間の違いを考慮する必要がある。これらを考慮した上で組刺激提示間隔、CS と US の提示の時間関係を調節すれば、より効率よく学習の獲得、記憶が形成されるはずである。そこで、刺激提示の途中で化学反応が充分進むよう、刺激を与えない休息時間をはさんで条件づけし、これを分散学習群とし、これまでのように一定の間隔で組刺激を与える群を集中学習群として比較した。その結果、集中学習群では LTM が形成されない少ない組刺激提示（8 回の組刺激）であっても、5 回と 3 回の間に 1 時間あるいは 3 時間の休息時間をはさんで提示すると、3 時間あけた群、1 時間あけてブライオスタチン処理をした群で LTM が形成されたが、1 時間あけた群では LTM が形成されなかった。これはあけた 3 時間の間に C キナーゼを介したタンパク質合成と遺伝子発現の変化が進み、LTM が形成されたと考えられた。上述した記憶形成にかかわるリン酸化依存性、温度依存性、時間依存性の実験から、条件づけ直後と 3 時間後が STM から LTM 形成に移行する臨界期で、この間に一連の反応が細胞内で起こることにより長期記憶が形成されると推測された。このことは、これまでの作業仮説を支持する結果であった。

従来用いられた US としての忌避刺激である機械的接触刺激は、刺激の定量的提示が困難で実験者の提示技術が条件づけの成否を左右してしまう。この点を改良するため、常に一定強度を保ちやすい US 刺激として電気刺激を用いたところ、条件づけの作業効率が大幅に向上した。そこで、電気刺激を用いて条件づけを自動化する方法を検討した。電気刺激は積層乾電池（9V）を用い、加えて、ショ糖刺激と常時流す水流を 2 台のポンプ駆動とし、これら刺激を提示するタイミングは独立した 3 チャンネルの電気刺激装置から発生させた。電気刺激装置出力はトランジスタ・トランジスタ論理（TTL）のため、CS と US 提示用の各デバイスを駆動するためにトランジスタ回路を介した。さらに本自動化装置では、10 個の独立した実験チャンバーを用意し 10 匹の動物を同時に条件づけできるよう設計した。本装置を用いて CS と US の提示タイミング、組刺激回数、組刺激を与えるパターンといった条件を変化させて再検討したところ、CS として 100mM のショ糖を 10 秒、US として 0.4 μ A の電気刺激で刺激持続時間を 0.2 秒とした場合には 5~20 回の組刺激提示で LTM が形成された。さらに US の刺激持続時間を 5 秒とすると 1 回の組刺激提示で STM、LTM が形成された。本研究で開発した自動化装置は、条件づけに関わる様々なパラメータを系統的に変化させて解析することに適しており、今後のモノアラガイの味覚嫌悪条件づけの研究に有効に活用されることが期待できる。