

審査結果の要旨

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

本論文は学習・記憶の神経機構を探るために、これまでに多くの研究結果が報告されているヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) をモデル動物として用い、行動学的手法を中心に、更に生理学的、薬理的検討を加え解析し、連合学習の様式である味覚嫌悪条件づけに関してその神経機構を検討している。ここで扱っているモノアラガイの味覚嫌悪条件づけとは、条件刺激としてショ糖を与えその直後に皮膚への一定強度の接触刺激または電気刺激といった侵害性の無条件刺激を与え、これらの組み刺激を繰り返すことにより、条件刺激であるショ糖に対して本来は咀嚼行動を示していた動物が、条件づけ獲得後にはショ糖を提示しても咀嚼行動が抑制されるという行動変化を起こすものである。また行動学的解析を行う上では、これまで作業仮説として提唱されている記憶のタイプと細胞レベルでの変化との対応を考慮して研究が進められている。この作業仮説とは、数分間持続する短期記憶 (STM) はニューロン内のカルシウムイオン濃度の変化や膜タンパク質の修飾と対応し、2~3 時間持続される中期記憶 (ITM) は新規なタンパク質の合成、24 時間以上持続する長期記憶 (LTM) には遺伝子発現の変化を必要とするというものである。

まず、学習獲得と記憶形成に対するプロテインキナーゼ C (以下 C キナーゼと略す) の関与が検討された。C キナーゼの活性化剤であるブライオスタチンとその阻害剤である Ro-32 を用い、条件づけ前後のいくつかのタイミングでこれらの薬剤処理を行うことで条件づけ成立にどのような影響が出るか検討された。その結果、ショ糖を条件刺激、頭部への機械的接触を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけにおいて、あらかじめブライオスタチン処理を行うとより少ない組み刺激回数で条件づけが成立すること、Ro-32 処理により STM は阻害されないが LTM が阻害されること、ブライオスタチン処理は STM から LTM への移行を促すことなどを見出している。これらは、C キナーゼの活性化が学習の獲得、特に STM から LTM への移行に重要であることを示している。

次に、細胞内の生化学的な反応を遅らせる方法として、モノアラガイを 5°C に冷却するという方法を用い、様々なタイミングで冷却を行うことで記憶形成に与える影響が検討された。その結果、味覚嫌悪条件づけにおいて、組み刺激提示直後と 3 時間後に冷却すると STM、LTM 共に形成が阻害されること、一方、組み刺激提示後 4、7 分後のタイミングでは STM は形成されるが LTM は形成されないこと、組み刺激後 10、15 分後では STM、LTM 共に形成されることを見出している。

この様に見つけられた学習獲得に大きく影響を与えるタイミングを念頭に、従来言われている集中学習と分散学習の学習効率の違いが検討された。なおその際、これまで用いられてきた無条件刺激としての機械的接触は刺激の定量化が難しいとか、実験者の手技によるばらつきが

生じやすいなどの欠点があり、それを克服するためにより定量的な無条件刺激として電気刺激の導入が行われた。電気刺激がこれまでの侵害性刺激と同様の受容経路を取ること、刺激として適切な強度域などを確認した上で、電気刺激を用いた集中学習と分散学習の効果とそれに対する C キナーゼの関与が行動学的手法で詳細に検討された。その結果、集中学習では LTM が成立しない 8 回という少ない組み刺激回数でも、5 回の組み刺激後に 3 時間の休息時間を与え、その後 3 回の組み刺激を与えると LTM を形成するが、1 時間の休息時間では不十分であること、1 時間の休息時間でもその間にブライオスタチン処理を行うと LTM が形成されることを見出している。これらは、組み刺激直後に STM から LTM への移行までの細胞内過程が全て進むか、組み刺激後 3 時間の時点で STM から LTM へ移行するための C キナーゼの活性化を中心とした細胞内過程の進行が強化されることが必要であること、そしてまた、これまでの作業仮説である条件づけ数時間後に起こる STM から LTM への移行時の遺伝子発現変化の必要性に C キナーゼが強く関与するという仮説を支持する結果であることを示している。

無条件刺激としての電気刺激の有効性が示されたことで、更に味覚嫌悪条件づけを自動的に実行する装置が本論文で新たに考案され、実際に作製され、それを用いた条件づけの結果が示された。その結果は、作製された条件づけ自動化装置は経験を積んだ実験者が手動で行う条件づけと同等のデータが得られるものであること、実験者の熟練度によらず条件づけ時の刺激提示のばらつきが抑えられる装置であること、また 10 匹の動物を同時に条件づけできるという行動実験の作業効率を大幅に高めるものであることなどが示された。この装置の開発は、今後、条件づけ動物を用いた電気生理学的実験、生化学的実験、そして分子生物学的実験を効率的に行う上で、大きな利点となることが期待できる。

以上のように、本論文ではヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪条件づけをモデルとして、学習・記憶の神経機構としてこれまで提唱されている作業仮説を検討し、その仮説の重要な期間、例えば STM から ITM そして LTM へ移行する期間を明らかにし、また、そこに C キナーゼの関与が大きいことを示している。

申請者は 2015 年 12 月 16 日に行われた学位論文公聴会においても理路整然と発表し、その後の質疑応答でも、基本的な事柄から応用的な内容まで広範囲の質問に的確に対応した。また、本学位論文に記された成果は、学会誌等に 6 報の筆頭著者としての発表、そして 3 報の共著者としての発表済みである。

以上のことを鑑みて、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員的一致で判定された。従って、申請者 滝上 慧 は東海大学博士（理学）の学位を授与されるに値するものと判断する。

論文審査委員

主査	理学博士	須田 齋	理学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士 (医学)	高雄 元晴	情報理工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士 (薬学)	庄司 隆行	海洋学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	医学博士	榊原 学	工学部客員教授	
委員	理学博士	堀越 哲郎	工学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)