

東海大学大学院平成 27 年度博士論文

モデル動物における連合学習神経基盤の研究

指導 榊原 学 教授
堀越 哲郎 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

滝上 慧

—目次—

第1章 総合諸言	P. 4
1.1. モデル動物としてのヨーロッパモノアラガイ	
1.2. 連合学習	
1.3. 古典的条件づけ	
1.3.1. 味覚嫌悪条件づけ	
1.3.2. 光—振動条件づけ	
1.4. 記憶形成の作業仮説	
1.5. 本研究の目的	
第2章 味覚嫌悪条件づけの方法	P. 13
2.1. 諸言	
2.2. 方法	
2.2.1 実験動物	
2.2.2 行動観察のための実験装置	
2.2.3 味覚嫌悪条件づけ	
2.2.4 統計的検定法	
2.3. 結果とその解析例	
第3章 学習獲得・記憶形成に関わる神経機構	P. 21
3.1. 第3章総合諸言	
3.1.1. 記憶形成の固定化プロセス	
3.1.2. 記憶形成の強化方法	
3.1.3. 記憶形成の阻害方法	
3.2. 学習獲得と記憶形成に関わるCキナーゼの役割	P. 25
3.2.1. 目的	
3.2.2. 方法	
3.2.2.1. 動物の薬理的処理	
3.2.2.2. Cキナーゼの活性化による記憶の強化の実験法（実験1）	
3.2.2.3. Cキナーゼ活性化のタイミングにより形成される記憶（実験2）	
3.2.3. 結果	
3.2.3.1. 実験1：Cキナーゼの活性化による記憶の強化の実験法	
3.2.3.2. 実験2：Cキナーゼ活性化のタイミングにより形成される記憶	
3.2.4. 考察	

3.3. 記憶の強化は温度に依存する	P. 44
3.3.1. 目的	
3.3.2. 方法	
3.3.3. 結果	
3.3.3.1. 実験 1—分散学習と集中学習の効果と冷却阻害の影響	
3.3.3.2. 実験 2—記憶の形成プロセスの冷却タイミングによる検討	
3.3.3.3. 実験 3—冷却阻害の可逆性	
3.3.3.4. 実験 4—STM 形成時の C キナーゼの関与	
3.3.4. 考察	
3.3.4.1. LTM 形成のメカニズムとそれに対する冷却の影響	
3.3.4.2. 記憶形成の初期過程	
3.4. 集中学習と分散学習の生理学的意味	P. 61
3.4.1. 電気刺激を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけ	
3.4.1.1. 目的	
3.4.1.2. 方法	
3.4.1.2.1. 電気刺激装置	
3.4.1.2.2. 高電圧刺激によるモノアラガイの行動変化	
3.4.1.2.3. 味覚嫌悪条件づけ	
3.4.1.3. 結果	
3.4.1.3.1. 高電圧刺激によるモノアラガイの行動変化	
3.4.1.3.2. 無条件刺激を電気刺激とした味覚嫌悪条件づけ	
3.4.1.3.3. 記憶の保持期間	
3.4.1.4. 考察	
3.4.2. 集中学習と分散学習	P. 75
3.4.2.1. 目的	
3.4.2.2. 方法	
3.4.2.2.1. 集中学習と分散学習	
3.4.2.2.2. 動物の薬理学的処理	
3.4.2.3. 結果	
3.4.2.3.1. 合計 20 回の組刺激を 4 日間で行う分散学習	
3.4.2.3.2. 集中学習と分散学習による記憶形成	
3.4.2.3.3. C キナーゼ活性化による記憶形成の強化	
3.4.2.4. 考察	
3.5. 第 3 章まとめ	P. 88

第4章 味覚嫌悪条件づけの自動化装置開発の試み

-自動学習装置の試作とその実用度の検証- P. 91

4.1. 諸言

4.2. システム構築

4.2.1. 電気回路

4.2.2. 装置設計と作製

4.3. 方法

4.3.1. 自動装置を使用した味覚嫌悪条件づけ

4.4. 結果

4.4.1. 9V、0.4 μ A 電気刺激の効果

4.4.2. 自動装置の動作

4.4.3. 味覚嫌悪条件づけ自動化装置の性能評価

4.4.3.1. STM/LTM の形成

4.4.3.2. 組刺激間隔の延長による効果

4.4.3.3. 一試行条件づけ(One-trial conditioning)

4.4.3.4. 外套膜への電気刺激による LPeD11 の応答

4.5. 考察

4.5.1. 刺激時間延長の効果

第5章 総括 P. 109

5.1. 作業仮説の検証

5.2. モノアラガイにおける味覚嫌悪条件づけの新たな実験系の確立

5.3. 自動的味覚嫌悪条件づけの装置開発

謝辞

参考文献

第 1 章

総合諸言

1.1. モデル動物としてのヨーロッパモノアラガイ

学習・記憶に関わる神経機構を探る上で、脊椎動物では難しい単一神経細胞レベルでの生理的変化の解析及び、神経回路としての特性変化の理解のため、脊椎動物に比べてシンプルな構造を持ち、尚且つ基本的神経機構には共通性が示されてきているモデル動物として無脊椎動物が用いられる。無脊椎動物、特に軟体動物は神経細胞が大きいため(Fig. 1-2)、神経系の信号処理を解析する電気生理学の実験によく用いられてきた。中でも軟体動物腹足類の、アメフラシ(*Aplysia*, Castellucci et al., 1989)、ウミウシ(*Hermisenda*, Alkon et al., 1974)、ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis* (Fig. 1-1) 以下モノアラガイと記す) (Sakakibara et al., 1998)は学習獲得と記憶形成に関わる研究が多く、学習行動と神経系調節過程の対応も明確にされてきている(Alkon et al., 1987; Kandel et al., 1976)。中でもモノアラガイは後述するように多くの種類の連合学習が可能であり、それらに関する研究報告が多い。また、行動に関わる神経細胞、神経回路の研究が進んでおり多くの神経細胞、神経回路が同定されている。本論文では、行動の変化とそれに関わる神経細胞や神経回路の対応づけが可能なモノアラガイを対象として、学習獲得と記憶形成の神経分子機構を主に行動学的観点から検討した。

1.2. 連合学習

動物実験では行動の変容が学習獲得の目安となることから、条件づけの結果による行動の顕著な変化が観察できる連合学習がよく利用される。連合学習にはパブロフのイヌに代表される古典的条件づけと、スキナーの行ったレバー押しによる餌の獲得という報酬を介した道具的(オペラント)条件づけがあるが、本論文では古典的条件づけに的を絞って考察する。

モノアラガイでは、生命維持に関わる摂食行動と好適刺激、あるいは忌避刺激を組み合

わせれば、パブロフ流の古典的条件づけが可能なが知られ、それぞれ、味覚嗜好条件づけ(Kojima et al., 1996)、味覚嫌悪条件づけと呼ばれている(Kawai et al., 2004; Takigami et al., 2013a, b)。また呼吸行動と忌避刺激を組み合わせたオペラント条件づけ(Lukowiak et al., 1996)に関しても多くの報告があるが本論文では取り上げない。

パブロフの古典的条件づけでは、イヌにおいて動物行動の引き金となる肉のにおいと、イヌにとっては無意味なメトロノームの聴覚刺激を時間的に組み合わせて繰り返し提示すると、イヌは餌とは無関係なメトロノームの音を聞いただけで、唾液を分泌するようになる。これは、肉のにおいとメトロノームの音が繰り返し提示されることにより動物の頭の中で時間的な相関関係が意味を持ち、メトロノームの音が肉のにおいに結びついて、唾液分泌という生理現象をひきおこすと解釈されている。すなわち、条件刺激と無条件刺激を時間的に組み合わせて繰り返し提示すると、条件刺激だけの提示が引き続く無条件刺激を想起させることにより学習が成立する。加えて、無条件刺激の持続時間と動物に加えられる強度に依存して記憶が形成されるといわれている(Sugai et al., 2007; Takigami et al., 2016)。

1.3. モノアラガイ古典的条件づけ

これまでの研究では、モノアラガイは、味覚刺激—接触刺激(Kawai et al., 2004)、味覚刺激—化学刺激(Kojima et al., 1996)、光刺激—振動刺激(Sakakibara et al., 1998)といった異種の感覚刺激の組み合わせで古典的条件づけが成立するとする報告がある。以下にこれまでの研究を要約する。

1.3.1. 味覚嫌悪条件づけ

これまでに報告のある味覚嫌悪条件づけは、最初に動物の好むシヨ糖溶液を提示し（条件刺激:CS）、ついで動物の嫌悪する皮膚への強い接触といった無条件刺激(US)を提示する。

このような組刺激（条件刺激＋無条件刺激）を繰り返し動物に与えることにより、動物は、それぞれの刺激の時間的なパターンを学習し、ある段階から、条件刺激の提示だけで無条件刺激を想起して無条件応答（咀嚼運動の停止、あるいは殻への引き込み）を示すようになる(Kawai et al., 2004; Kojima et al., 1996; Sakakibara et al., 1998; Ito et al., 2015; Takigami et al., 2013a, b, 2014b, c, d, 2016)。すなわち、化学刺激である KCl 溶液の提示、あるいは体表へ加えられる機械的接触刺激を無条件刺激として用い、条件刺激と無条件刺激の繰り返しにより学習を獲得するものであった。その繰り返し刺激の提示に関して、無条件刺激が強すぎると、動物は殻に引き込み完全な防御姿勢を示すため、条件応答の観察は困難となるという問題があった。これまでの味覚嫌悪条件づけでは、組刺激の繰り返し提示（トレーニング）により、条件刺激であるショ糖溶液の提示に対して、咀嚼行動（1 分間の口の開閉数）の減少をもって評価している。条件づけ 10 分後、24 時間後に CS を提示したときの口の開閉数を 10 分後(Post-Test 10min)、24 時間後テスト(Post-Test 24h)の値として、それぞれ短期記憶、長期記憶の指標と定義して研究が進められてきている。

1.3.2. 光—振動条件づけ

モノアラガイは光照射に対して顕著な行動は示さず、振動刺激には殻への引き込み応答が観察される。そこで、これら光照射と振動をある時間関係で組み合わせて繰り返し提示することにより学習が成立する(Sakakibara et al., 1998, 2005, 2006)。すなわち、最初に光刺激を提示し、直後に動物に振動刺激を負荷すると、光の提示がその後の振動刺激を想起させ、殻に引き込むようになる。この学習では、学習を獲得した動物では光刺激の提示後、ある遅れ時間を伴って殻に引き込むことから、この遅れ時間の逆数を指標として学習行動が評価できる。すなわち、学習が獲得されなければ、光刺激に対して引き込み反応が起こらないため遅れ時間は無限大となり、その逆数は 0 となる。このようにして学習の成立や記憶が行動評価されてきている。

味覚嫌悪条件づけ、光—振動条件づけは、いずれも条件刺激と無条件刺激の組み合わせた刺激の時間パターンを学習するもので、刺激提示の順序を逆転させれば学習行動は観察されず、この逆手順条件づけが、古典的条件づけ成立を裏付けるための対照実験として行われている。

1.4. 記憶形成の作業仮説

上述したような条件づけの後、学習に関わる神経細胞において以下に示すプロセスが行うことが作業仮説として提示されている。記憶形成のために必要なプロセスは分子的メカニズムより短期記憶(Short Term Memory : STM)、中期記憶(Intermediate Term Memory : ITM)、長期記憶(Long Term Memory : LTM)に分類され、数分間持続する STM は既存のタンパク質の修飾だけを必要とし、2~3 時間の間持続する ITM では新規タンパク質合成が必要で、そして、1 日からより長期に持続する LTM では新規タンパク質合成だけではなく、遺伝子発現の変化が必要とされる(Abraham et al., 2008; Castellucci et al., 1989; DeZazzo et al., 1995; Ramirez et al., 1998; Sangha et al., 2003; Schafe et al., 2000; Scheibestock et al., 2002; Sutton et al., 2001; Wustenberg et al., 1998; Takigami et al., 2014b; Takahashi et al., 2013)。

1.5. 本研究の目的

モノアラガイではその行動に関わる神経細胞の一部が神経細胞の繋がりとして同定されており(Benjamin et al., 2000; Lukowiak et al., 2014)、連合学習による行動変化が特定の神経細胞の可塑的变化として個々の細胞で調査することが可能なモデル動物とされる。本研究では味覚嫌悪条件づけを対象に主に行動学的結果と神経細胞内変化を対応づけることを目的として行った。本論文第 2 章では本研究の基盤となる味覚嫌悪条件づけの方法論を解説し、

第3章以降より以下の事象について順次示した。

第3章では学習獲得・記憶形成に関わる神経機構を3点から調査した。一般に記憶形成は短期記憶、中期記憶、長期記憶として分類され、其々の記憶において、学習に関わる神経細胞での変化は異なる。先述した記憶形成過程の分子メカニズムを作業仮説として念頭に置きながら1) 記憶形成に対するタンパク質キナーゼC（Cキナーゼ）の役割、2) 記憶形成の分子プロセスに対する温度変化の影響、加えて、本研究によって新たに導入された方法である無条件刺激を電気刺激とする味覚嫌悪条件づけを用いて、より厳密な時間制御下での3) 集中学習と分散学習の学習効率への効果についても検討した。

第4章では無条件刺激を電気刺激とした味覚嫌悪条件づけを実現する自動味覚嫌悪条件づけ装置の開発と、それを用いたモノアラガイへの条件づけについて調査した。電気刺激を無条件刺激とすることで無条件刺激の実験者に起因する刺激強度のばらつきをほぼ0とすることができる。また、実験者の手技によるばらつきを伴わずに機械的に条件刺激及び無条件刺激をモノアラガイへ供給することを可能とすることで、各種の条件下で効率良く条件づけを成立させることが可能であることが予想され、これを実験的に確認した。その結果、作製した自動味覚嫌悪条件づけ装置は設計通りに動作し、1回に10匹のモノアラガイを同時に条件づけすることが可能となった。

第5章では本研究を総括し、モノアラガイの味覚嫌悪条件づけを対象に本研究の主なテーマである以下の3点について議論した。1. これまでの神経機構の分子メカニズムの作業仮説が行動学的視点から検討された研究結果、2. 新たに確立した電気刺激を無条件刺激とする味覚嫌悪条件づけの研究結果、3. 2を発展させて開発した味覚嫌悪条件づけの自動化装置による研究結果についてである。

図と図の説明



Fig.1-1 ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*)

モノアラガイは二つの触覚を持ち、その基部に眼を有する。この部位を頭と呼び、頭の下部全体が化学感覚を多く有する口周辺皮膚である。この写真では見えないが口周辺皮膚の内側に口がある。



Fig.1-2 ヨローロッパモノアラガイ中枢神経節
モノアラガイの中枢神経節は複数（11 個）の神経節に別れており、それぞれの神経節は多数の神経細胞（神経節内で多数の球状に見える）で構成されている。

第 2 章

味覚嫌悪条件づけの方法

2.1. 諸言

本章では本研究（第3章、3.2 及び 3.3）で使用される味覚嫌悪条件づけの方法を解説する。第1章に示したように条件刺激(CS)としてショ糖溶液の提示、無条件刺激(US)として侵害刺激である皮膚への機械的接触を時間的に組み合わせて提示することで(Fig. 2-1B)、モノアラガイは、この2つの刺激の時間関係を学習し、咀嚼行動を引き起こすショ糖に対して、あえて積極的に咀嚼行動を引き起こさなくなる(Kawai et al., 2004; Kojima et al., 1996; Ito et al., 2015)。このモノアラガイの条件づけによる行動変化は学習に関わる神経細胞の変化によって引き起こされ、その結果が行動の変化として現れる。

モノアラガイを使用した味覚嫌悪条件づけにおいて、行動学的に記憶を定義づける尺度として単位時間当たりの咀嚼回数が用いられる(Kawai et al., 2004; Kojima et al., 1996)。モノアラガイにとってショ糖は好む刺激であり、ショ糖提示は咀嚼行動を引き起こす。しかし、組刺激によって条件づけを行うと、ショ糖の提示後に嫌悪刺激が提示されることを学習した動物はショ糖に対して咀嚼行動を示さなくなる。これは、モノアラガイにとっての防御反応である殻引き込み行動が優先され、それによって咀嚼行動が抑制される為である。条件づけによって行動変化を引き起こすことから、モノアラガイの神経細胞群からなる中枢神経節において咀嚼と殻引き込みに関わる神経回路が修飾され、この変化が維持されることで結果として行動変化が持続すると解釈される。

2.2. 方法

2.2.1 実験動物

東海大学開発工学部生物工学科、榊原・堀越研究室の飼育室で繁殖、飼育されているヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis* : オランダ自由大学に由来) の、殻長 25~30mm の成体を実験動物とした。飼育水槽の水温は 22~24°C に保たれ、飼料としてキャベツ、錦

鯉の餌(KYORIN Co., Ltd.; Hikari Staple)と亀の餌(Spectrum Brands Japan & Spectrum Brands, Inc.; Tetra ReptoMin)を与えた。動物の光環境は午前 8 時に蛍光灯照明が入り、午後 8 時に切れるようにタイマーで制御した。

2.2.2 行動観察のための実験装置

実験は室温 22~24°Cの室内で行った。装置はプレキシガラス製の培養皿（直径 60mm、深さ 20mm）にアクリルパイプ（直径 5mm）とゴムホースによって灌流流路を自作し、毎分 250ml の水（数日間の通気で脱塩素した水道水）で灌流した(Fig. 2-1A)。モノアラガイの咀嚼行動（口の開閉回数）はプラスチックシャーレの下方に置いた鏡により観察した(Fig. 2-1A)。

2.2.3 味覚嫌悪条件づけ

実験には 24 時間絶食したモノアラガイを使用した。絶食したモノアラガイを実験装置のシャーレに移し、10 分間装置の環境に順応させた。その後、注射筒(TERUMO CORPORATION,)を使用して、100mM のショ糖を 5 秒間、口付近に 1ml 滴下して提示し、1 分間の咀嚼行動の回数を目視により計測する実験前テスト(Pre-Test)を行った。Pre-Test の 10 分から 15 分後に組刺激の提示を行った。組刺激と組刺激の間隔は通常 1 分間とした。組刺激は、条件刺激 (CS : 100mM ショ糖 1ml/5s) 提示直後に無条件刺激(US)を与えた。US はアクリル樹脂製棒（直径 2mm、先端直径約 0.5mm）によってモノアラガイの頭部に棒の先で接触刺激した。刺激強度は殻引き込み行動が数秒間起こされるものとした。実験パラダイムとして(Fig. 2-1B)、CS-US の組刺激を与える回数はこれまでの報告をもとに 20 回とした。条件づけの効果が記憶として定着したかは、一連の組刺激提示終了後の 10 分後(Post-Test 10min)、24 時間後テスト(Post-Test 24h)で示される CS に対する口の開閉数が、Pre-Test に比

べて統計的に少なくとも危険率 $p < 0.05$ 以下で有意に減少したと判定された場合に記憶が形成されたとした。さらに、このような条件づけが、刺激提示の順序に依存したものであることを確認するために、CS-US の順序を逆転した、US-CS の繰り返し提示では学習行動が起こらないことも確認した。このパラダイムを逆手順(Backward)条件づけと呼ぶ。(Fig. 2-1C)。

2.2.4 統計的検定法

条件づけ前後での行動の変化は、基本的には多重比較分散分析法によった。まず要因によって分類される群が、同じ群と言えるかに関して要因分散分析を行い、ここで有意差があれば、シェッフエの多重比較法を適用し、 p 値を算出した。これら統計的検定には KaleidaGraph (HULINKS Inc.)を用いた。統計処理は行動実験者とは異なる実験者が計算した。

2.3. 結果とその解析例

Pre-Test と Post-Test 10min 及び、Post-Test 24h を比較した(Fig. 2-2)。CS に対する 1 分間の咀嚼回数は Pre-Test : 15.7 ± 0.48 回 (平均 \pm 標準誤差) に対して Post-Test 10min : 3.4 ± 1.36 回であり、これら双方を比較すると Pre-Test に対して Post-Test 10min で有意に減少した($p < 0.0001$)ことから短期記憶が形成されたと判断した。更に、Post-Test 24h でも 8.4 ± 1.23 回と Pre-Test に対して有意に減少した($p < 0.0001$)ことから長期記憶を獲得したと判断される。このようにして記憶形成の長期記憶化はモノアラガイの咀嚼行動の変化から判断される。

第 3 章では、味覚嫌悪条件づけによって引き起こされるであろう神経節中の細胞内変化を記憶強化と記憶障害を使用した行動学的結果と対応させることで検討した。記憶形成に関わる神経細胞内変化はこれまでの研究で議論され、その作業仮説が提案されている。こ

の作業仮説が行動学的データとどこまで対応しているかを検証するのが本研究の大きなテーマである。

図と図の説明

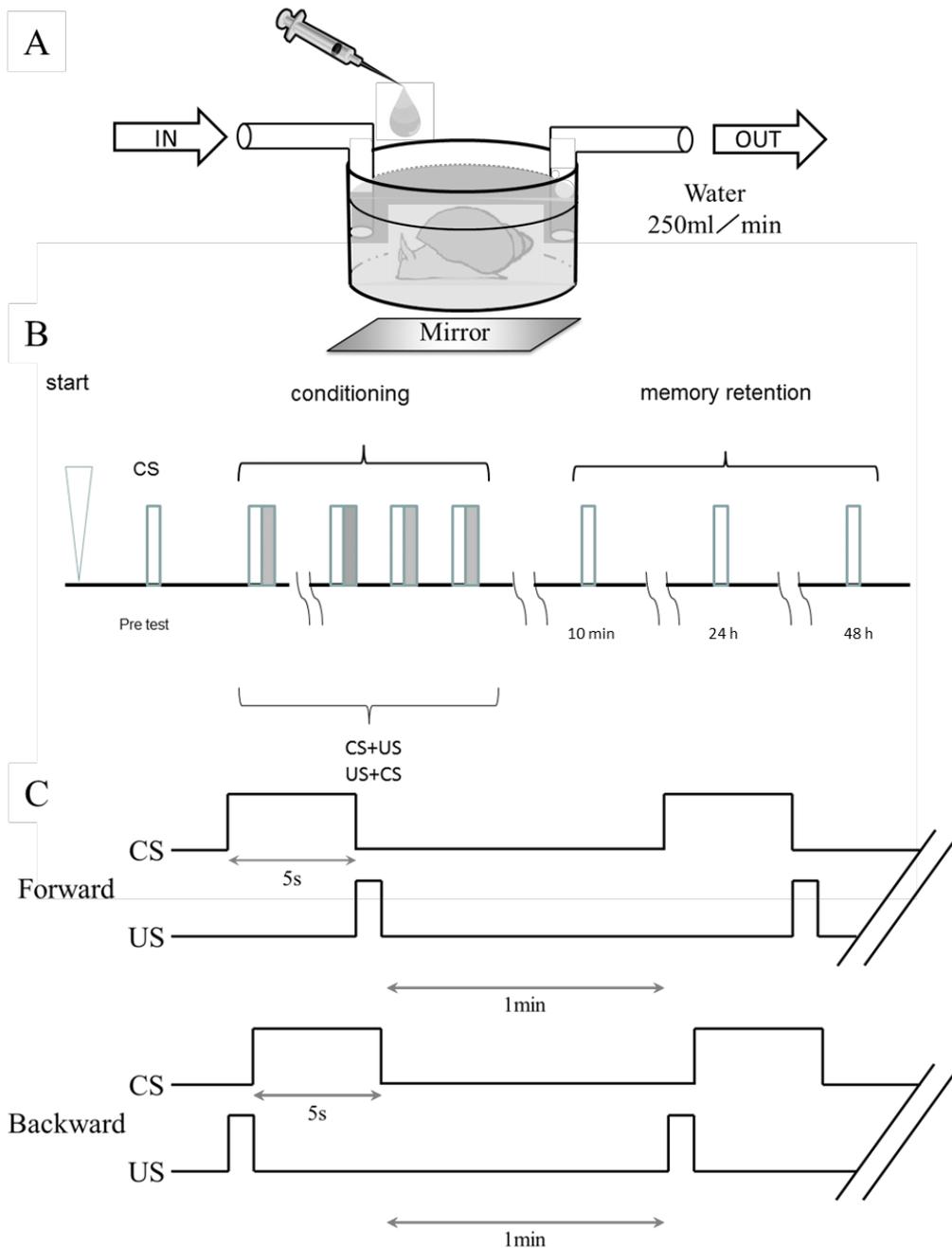


Fig. 2-1 味覚嫌悪条件づけの方法

実験装置の模式図(A)。水を 250ml/min で灌流している培養皿内にモノアラガイを入れ、その咀嚼行動は下部に置いた鏡により観察した。実験パラダイム (B)。実験開始からモノアラガイを 10-15 分間静置し、Pre-Test として 1 分間のショ糖に対する咀嚼回数を記録した。その後、10 分間静置した後に条件づけを行った。条件づけ後、Post Test として Pre Test 同様にショ糖に対する咀嚼回数を記録した。刺激を与えるパターン(C)。Forward 群では 1 分間隔で 5 秒間のショ糖提示直後に機械的接触刺激を行った。Backward 群においては 1 分間隔で機械的接触刺激後、5 秒間のショ糖を提示する組刺激を行った。

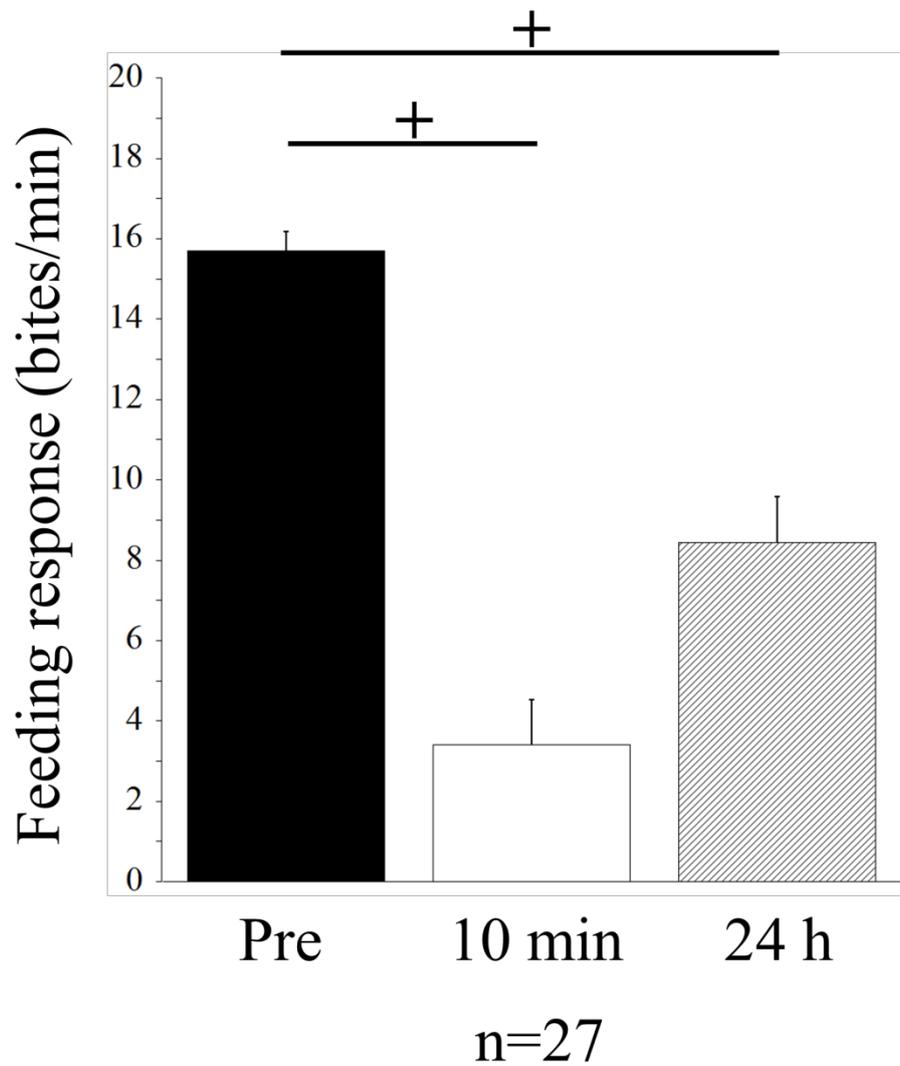


Fig. 2-2 味覚嫌悪条件づけモノアラガイの記憶形成

20回の組刺激とする条件づけを行い、Post-Test 10min、Post-Test 24hのショ糖に対する咀嚼回数を比較した。20回の組刺激によってモノアラガイは短期記憶及び、長期記憶を獲得した。データは平均値±標準誤差で示した。(† $p < 0.0001$)

第3章

学習獲得・記憶形成に関わる神経機構

3.1. 第3章総合諸言

3.1.1. 記憶形成の固定化プロセス

腹足類モデル系 (*Hermisenda crassicornis*: ウミウシ、あるいはモノアラガイ) では古典的条件づけで LTM を形成する為に必要な感受性期は条件づけの組刺激提示終了後 10 分以内及び、180 分にあると言われている(Epstein et al., 2003; Fulton et al., 2008; Takahashi et al., 2013)。これら二つの感受性期は記憶固定化プロセスのための高分子タンパク質合成と新規 mRNA 合成の時間経過と相関する。このことはタンパク質合成阻害剤、転写反応阻害剤を用いた薬理学的実験により報告されている(Fulton et al., 2005)。しかし様々な薬物を用いた実験では、神経組織は可逆的に回復することはまれで、回復過程での応答は不明のため、記憶形成に必要なシナプス前後で発生する神経細胞における連続した分子的事象を見落とししてしまう可能性がある。分子的事象の見落としは、それと対応する STM、ITM、LTM 形成が進行する過程の見落としとなる。以下にこれまで行われてきた記憶形成プロセスの調査方法を概説した。

3.1.2. 記憶形成の強化方法

CS としてショ糖、US として KCl を使用したモノアラガイの味覚嫌悪条件づけ(Ito et al., 2013; Kojima et al., 1996)では Protein Kinase A(PKA、以下 A キナーゼ)と cyclic AMP response element binding protein (CREB)が LTM 形成に関与することが報告されている(Azami et al., 2006; Sadamoto et al., 2004)。また、このパラダイムの連合学習では軟体動物インスリン受容体が LTM 形成に関与することも示唆された(Murakami et al., 2013)。しかし、C キナーゼはシナプス形成を調節する Hud または mRNA 固定化経路などシナプス形成を誘導する他の経路に加えて CREB を強力に活性化させるとの報告もあり、A キナーゼ以上に LTM 形成により強力に関与し、移行を促進させると考えられている(Pascale et al., 2005; Quattrone et al., 2001)。C キナーゼ活性化の記憶形成への関与は軟体動物や齧歯類で研究されており(Alkon et al.,

1988; Bank et al., 1988; Nelson et al., 1990; Olds et al., 1989; Takigami et al., 2014b)、最近の研究では、C キナーゼの同位酵素である PKM ζ が、味覚嫌悪条件づけや、恐怖条件づけと空間学習の記憶形成に関与すると報告されている(Pastalkova et al., 2006; Shema et al., 2007; Yao et al., 2008)。ウミウシの研究において、C キナーゼの活性化剤である Bryostatin (C₄₇H₆₈O₁₇: ブライオスタチン、または Bryo)が LTM への形成を促進すると報告されている(Alkon et al., 1998, 2005)。C キナーゼ活性化剤であるブライオスタチンは外肛動物であるフサコケムシ (*Bugula neritina*) から単離されたマクロラクトン化合物であり、C キナーゼ活性化型膜タンパク質のリン酸化を介して、新規タンパク質合成、さらに mRNA の修飾に関与する。また、ブライオスタチンの低用量処理(<1nM)を行ったウミウシを使用した光 - 振動条件づけにおいては、C キナーゼの活性化により必要となる新規タンパク質合成が起き、記憶をより長期化された強化型 LTM (consolidated long-term memory: CLTM と呼ばれた) 形成につながる事が観察された(Alkon et al., 2005; Epstein et al., 2003; Epstein et al., 2004; Kuzirian et al., 2006)。

3.1.3. 記憶形成の阻害方法

ナメクジ(*Limax*)を用いた研究では、冷却によって記憶が阻害され、この現象は記憶の冷却阻害(cold-block)と呼ばれている(Yamada et al., 1992, Sekiguti et al., 1994; Takahashi et al., 2013)。連合学習による記憶形成後、冷却することによる記憶阻害はアメフラシ(*Aplysia*)、ショウジョウバエ(*Drosophila*)、モノアラガイなどの無脊椎動物を用いた研究によって確認されている(Fulton et al., 2008; Sangha et al., 2003; Xia et al., 1999)。ナメクジのような陸棲の動物を用いた研究では学習直後瞬時に動物の体内の温度を下げることは容易ではない。一方、モノアラガイは水棲のため冷水に入れて急激に体内温度を下げることは容易で、冷却阻害の効果を観察するには好適な材料である。

第3章

3.2. 学習獲得と記憶形成に関わる

Cキナーゼの役割

3.2.1. 目的

学習獲得のプロセスとして、組刺激の提示により、特定の細胞、あるいは細胞群の興奮性が長期的に変化することが観察され、これを担う機構として神経細胞膜上の機能的タンパク質のリン酸化あるいは脱リン酸化が想定されている。ウミウシの光一回転条件づけでは CS として使われた光照射により視細胞は興奮するが、直後に提示される US である振動刺激により興奮する平衡胞の有毛細胞からの信号が視細胞にフィードバックされ、視細胞の興奮性が抑制される。これら刺激の繰り返しにより、視細胞内のカルシウム濃度は上昇と下降が繰り返される(Alkon et al., 1985, 1987)。この反復される細胞内カルシウム濃度変化は、濃度依存的に活性化される種々のタンパク質リン酸化酵素を度々活性化する。ウミウシの例では、C キナーゼとカルシウム-カルモジュリン依存性のリン酸化酵素 (CaM キナーゼ II) が視細胞の興奮性の上昇に関与するとの報告がある(Farley et al., 1991)。学習前の状態に比較すれば、タンパク質キナーゼが関与して視細胞の K^+ 電流が長期的に不活性化されるために、結果的に興奮により脱分極した膜電位は再分極に時間を要し視細胞の興奮性が増加するために、CS 入力により平衡胞有毛細胞を経由する光に対する抑制行動が発現する。

これまでのウミウシの先行研究によれば、既に述べたように学習獲得にはタンパク質リン酸化酵素の C キナーゼ、CaM キナーゼ II が、またアメフラシでは A キナーゼ(Michel et al., 2008)、MAP キナーゼ(Michel et al., 2011)が学習獲得のスイッチの役割を果たすとの報告がある(Kandel et al., 2001)、本論文では学習初期に活性化する C キナーゼの役割を調査するため、C キナーゼに絞って学習獲得に関与するかをモノアラガイで検討した。

3.2.2. 方法

3.2.2.1. 動物の薬理的処理

C キナーゼ活性化剤、Bryostatin (LC Laboratories, Woburn MA、以下ブライオスタチン)は

100 μ l のエタノールで溶解した後、水で希釈して 1 μ g/ml のストック溶液とした。

ストック溶液を 2000 倍希釈した 0.5ng/ml の濃度の溶液 10ml にモノアラガイを入れ、45 分後に飼育水に入れ替えた。ブライオスタチンは脂溶性のため、モノアラガイの体内に入り C キナーゼが関与する組織のリン酸化を促進する。

C キナーゼ不活性化剤、Ro-32-0432 (LC Laboratories, Woburn MA、以下 Ro-32)は飼育水中に 80nM の濃度で溶解した。この溶液(10ml)にモノアラガイを入れ 20 分間浸漬して C キナーゼを不活性化した。

3.2.2.2. C キナーゼの活性化による記憶の強化（実験 1）

モノアラガイを使用した味覚嫌悪条件づけ方法においても従来の条件づけ方法に比べて C キナーゼの活性化で、より効率的に学習を獲得可能か検討した。Kawai らにより示された従来の機械的接触刺激を US とする場合、LTM を形成するには 1 日に 20 回の組刺激 (CS-US) が必要とされていた (Kawai et al., 2004)。そこで、ブライオスタチン処理した動物が、より少ない組刺激の提示により学習を獲得するか、そして形成される記憶はどれほどの時間維持されるかを、活性化剤のブライオスタチン（処理時間：45 分間）と不活性化剤の Ro-32（処理時間：20 分間）を用いて検討した。ブライオスタチンと Ro-32 の双方を使用した場合の処理方法は、45 分間の C キナーゼ活性化剤ブライオスタチンによる処理を行い、その後 20 分間の C キナーゼ抑制剤 Ro-32 による処理を行った。ブライオスタチン処理と Ro-32 処理を入れ替えた場合においても各薬剤の処理時間は同様とした。以下検討した記憶は、条件づけ後 10 分の時点、24 時間後の CS に対する口の開閉数を指標として、それぞれに相当する STM、LTM と定義して観察した。また、組刺激回数を 5 回、10 回、20 回と変えて STM 形成に要する最少組刺激回数を調査すると同時に、ブライオスタチン処理の効果を 10 回の組刺激回数によって調査した。

3.2.2.3. C キナーゼ活性化のタイミングにより

形成される記憶（実験 2）

本実験では C キナーゼを活性化するタイミングと、組刺激提示を行う時点を変えて、どの組み合わせが最も効率的に学習を獲得し、記憶の形成が起こるかを検討した。すなわち 20 回の組刺激の異なる時点で 45 分間のブライオスタチン処理を行い、LTM 形成を評価した。まず、条件 1 はブライオスタチン処理を実験前 (Fig. 3-2-1 EXP.2-1) までに、条件 2 は条件づけ開始直前 (Fig. 3-2-1 EXP.2-2) までに、条件 3 は条件づけ試行終了時にブライオスタチン処理が完了するようにした (Fig. 3-2-1 EXP.2-3)。条件 4 は Post-Test 10min テスト直前にブライオスタチン処理を完了するものとした (Fig. 3-2-1 EXP.2-4)。

3.2.3. 結果

3.2.3.1. 実験 1 : C キナーゼの活性化による記憶の強化

Post-Test 10min において 10 回の組刺激(10-Cont)により咀嚼回数が大きく減少するが、5 回の組刺激(5-Cont)では統計的に有意な変化は観察されない。このように 10 回以上の組刺激によって少なくとも STM が形成された (Fig. 2-3-2)。

一方、ブライオスタチン処理(0.5ng/ml)によりモノアラガイは 5 回の組刺激提示で STM が形成された (pre: 22.2 ± 0.87 bites/min; 10 min: 16 ± 1.21 bites/min ; 5-Bryo)。しかし、LTM は形成されなかった。これらの結果はブライオスタチンによる C キナーゼの活性化が STM 形成を促進することを示した。なお、ブライオスタチンの溶媒(0.005% ethanol)を使用した対照実験では、5 回の組刺激では STM の形成は観察できなかった。

ブライオスタチン処理を施したモノアラガイにおいて 10 回の組刺激提示(10-Bryo)により STM、LTM の両方が観察されたが、ブライオスタチン処理を行わないモノアラガイでは STM の形成は観察されたが LTM の形成は観察されなかった。得られた結果(pre-test: 20.4 ± 0.64

bites/min; 10-min post-test: 5.4 ± 1.05 bites/min; 24-h post-test: 16 ± 1.19 bites/min) ($p < 0.0001$, pre vs. STM [10-min post-test]; $p = 0.009$, pre vs. LTM [24-h post-test])の統計解析値を Table 3-2-1 に示した。

モノアラガイへ20回の組刺激を提示するとブライオスタチン処理の有無に関係なく STM、LTM はこれまでの報告のとおり形成された。さらに、ブライオスタチン処理を施すことにより STM、LTM は僅かに強化された(10 min: 1.6 ± 0.63 bites/min; 24 h: 14.8 ± 1.68 bites/min; with $p < 0.0001$; Fig. 3-2-2)。対照的に Ro-32 の処理によってモノアラガイの STM、LTM の形成は抑制され、Fig. 3-2-3 のように CS に対して咀嚼応答した。このように、Ro-32 処理は、20 回の組刺激を行った場合についても記憶の形成を有効に阻害した。また、Ro-32 により処理した場合(20-Ro)、処理しない場合(20-cont)であっても個体間ではバラつきが存在した。20-cont でも条件づけが成立しない個体、20-Ro でも条件づけが成立する個体が存在した(Fig. 3-2-3)。

要約すると、組刺激回数が増加すると Post-Test 時の咀嚼回数は減少する。モノアラガイへのブライオスタチン処理により、組刺激回数と同じであってもブライオスタチン処理群では Post-Test において咀嚼回数が大幅に減少する。ブライオスタチン処理を行わないモノアラガイで LTM を形成しない 10 回の組刺激であっても、C キナーゼを活性化させることにより LTM が形成される。記憶形成への C キナーゼ活性化の関与を Table 3-2-2 にまとめた。Table 3-2-2 は CS に対する咀嚼回数からみたブライオスタチンの効果をまとめたものである。

ブライオスタチンと Ro-32 の両方を使用した条件で、10 回の組刺激による条件づけを行った実験結果(Fig. 3-2-4)は STM が Ro-32 処理を施したのものも含む全ての条件で観察された。STM 形成は C キナーゼ活性化が僅であっても促進されたと解釈された。つまり、ブライオスタチン処理の後、Ro-32 処理を施したモノアラガイにおいても LTM は形成され、Ro-32 処理をブライオスタチン処理に先行させた場合においては、LTM は形成されず STM だけが形成され、Ro-32 処理単独では STM だけが形成された。対照動物の 10 分後テストと Ro-32

処理動物のそれを比較すると、それほど大きな違いはないものの、統計的には対照群では危険率 $p < 0.0001$ レベルの差があるが、Ro-32 群では危険率 $p < 0.05$ レベルの差であった。このことは Ro-32 処理下では STM 形成機構において、わずかな違いがあることを示唆しているのかもしれない。対照と比較して、STM 形成のための統計水準がブライオスタチン処理群と Bryo-Ro 群についても同様であったが ($p < 0.0001$)、STM を示す実際の咀嚼回数は単一ブライオスタチン処理より多かった (Bryo: 5.4 ± 1.05 bites/min; Bryo-Ro: 11.5 ± 0.99 bites/min)。重要なことは条件づけ前に C キナーゼが活性化され、その後 Ro-32 処理しても LTM は形成されていたことである。したがって、C キナーゼ抑制剤 Ro-32 はブライオスタチン処理によってすでに開始された LTM 形成過程は抑制できないと考えられる。

C キナーゼ活性化と記憶形成に関して、ブライオスタチンと Ro-32 の役割に関して Fig. 3-2-4 にまとめ、その統計値を Table 3-2-3 に示した。上述したように、一度ブライオスタチンにより C キナーゼが活性化されると Ro-32 による記憶阻害は起こらないが、最初に Ro-32 処理した後にブライオスタチンにより C キナーゼを活性化すると STM は形成されるが、LTM は形成されない。Table 3-2-3 中の確率はブライオスタチンによる C キナーゼ活性化状態のもとでの Pre-Test と Post-Test 10min と Post-Test 24h における CS に対する咀嚼回数をシェッフエの多重比較法により算出した。

3.2.3.2. 実験 2 : C キナーゼ活性化のタイミングにより

形成される記憶

実験 1 で示したように、対照群で 10 回の組刺激によって条件づけしたモノアラガイは STM を形成したが、LTM は形成されなかった (Fig. 3-2-2)。条件づけ手順の間、異なる時点でブライオスタチン処理を行ったモノアラガイにおいて、Pre-test 前に処理した動物 (条件 2) については他の群に比べて LTM 形成は薄弱であった ($p < 0.05$)。条件づけ手順における

条件4でブライオスタチン処理したモノアラガイは、STM ($p<0.0001$)、LTM ($p<0.0001$)、CLTM ($p<0.0005$)のように長期間咀嚼行動の抑制が観察された。このように、ブライオスタチン処理を条件づけ直後に行うことは、24時間持続していた記憶を48時間持続できるよう一層の強化が図られると考えられるが、実験2の条件3においてCLTMの検討は行っておらず言及できない。STM、LTM、CLTMの形成基準は実験2の条件4の結果(Table 3-2-4)で、Pre-Testとの比較に基づいた。

3.2.4. 考察

実験1の結果、一定以上のCキナーゼ活性化レベルがSTM、LTM形成に必要なことが示された。45分間のブライオスタチン処理後の10回の組刺激提示でLTMが形成されることは、ウミウシを使用した実験(Alkon et al., 2005; Kuzirian et al., 2006)に比べていかにCキナーゼの活性化が早いかを示している。ウミウシではCキナーゼを活性化させる為に実験前の2~3日間にブライオスタチンで処理する必要があるがあった。また、記憶が強化されてLTMとなるにはある程度のCキナーゼの活性化レベルが必要であるということは注目すべきである。STM形成にはブライオスタチンの有り無しに関わらず最少数の組刺激提示が必要である。しかしながら、ここでナノモル濃度のブライオスタチンが存在すればさらにLTMを形成するのに十分なCキナーゼによるリン酸化レベルとなり、LTMが形成されと考えられる。

Ro-32の効果とブライオスタチンとの相互関係がSTM、LTMそれぞれの記憶の状態が変わることは、これら薬剤の薬理効果の時間的順番が重要であることを反映している。ブライオスタチン処理後のRo-32処理(Bryo-Ro)による咀嚼行動の抑制はブライオスタチン単独での処理より大きい。しかし処理の順序を逆転するとSTMからLTMへの移行も起こらない(Ro-Bryo)。ブライオスタチン投与の時間を変えてみてもLTM形成に大きな影響はない。すなわち、実験した4つの場合のいずれにおいてもSTMはLTMに移行した。さらにCLTMに移行したのはブライオスタチンを20回の組み刺激提示の後だったが、この点に関しては

48 時間後の記憶を系統的に観察しておらず、言及することはできない。しかし、予め C キナーゼの活性化レベルが低いと、LTM は形成されない。

他の C キナーゼ活性化剤、たとえばよく使われるフォルボールエステルは発がん性を有する。ブライオスタチンの薬理効果は選択性が強く、強力な C キナーゼ活性化能を持ち、細胞毒性を示すことから抗がん剤などの性質を有する (Smith et al., 1985)。海水産軟体動物腹足類であるエムラミノウミウシ(*Hermisenda crassicornis* : ウミウシ) での検討では、2~3 日前にブライオスタチン処理をすると古典的条件づけが促進され、わずか 2 回の組刺激提示で STM が形成されるなどの効果が報告されている(Alkon et al., 2005; Kuzirian et al., 2006)。ウミウシでの実験結果を裏付けるように、モノアラガイでは C キナーゼ活性化により以下のような効果が観察された : (1) ブライオスタチン投与の効果は、条件づけ前、あるいは直後にそれを与えることにより記憶形成が強化された。(2) Ro-32 は条件づけ前、またはブライオスタチン処理前に投与することで LTM 形成を阻害した。(3) (2)とは逆に、条件づけ後、またはブライオスタチン処理後の Ro-32 処理は LTM 形成には阻害効果を示さない。ブライオスタチン処理はモノアラガイにおける STM 形成から LTM 形成、または CLTM 形成で味覚嫌悪条件づけの記憶を強化した(Fig. 3-2-2、Fig. 3-2-4)。さらに C キナーゼ阻害薬である Ro-32 は、学習獲得あるいは STM の形成を阻害しない。Ro-32 は C キナーゼに対する阻害剤であるにも関わらず STM 形成を阻害しないのは、電位依存性チャンネルを通して、学習獲得時、STM 形成時にカルシウムの初期流入による C キナーゼの自己リン酸化による可能性が考えられ、あえて外部から C キナーゼを活性化する必要がないのかもしれない。

実験 2 において、全てのモノアラガイ(n=71)の Pre-Test と Post-Test 10min の咀嚼回数を比較して有意な減少を示した($p<0.001$)。本結果は、少なくとも 10 回の組刺激が STM からその後の記憶形成を引き起こす上で必要であることを示し、ブライオスタチン処理は 4 つのタイミングに関係なく、LTM への記憶形成を強化したことを示した($p<0.05$)。実験 2 の条件 3 において、ブライオスタチン処理を行うことによって対照と比較して LTM への移行を

促した。10回の組刺激後のブライオスタチン処理（条件4）ではLTMからCLTMへと記憶形成が移行したことが示されるが、実験2の条件1-3で48時間後の咀嚼回数は検討をしていないことから、今の段階ではCLTM形成へのCキナーゼの活性タイミングの影響に関しては更なる言及はできない。

3.1.2. に述べた内容をふまえて、STMから長期化する記憶に関して、これまでに提案された仮説を以下にまとめる。タンパク質新生が起こる期間を中期記憶(ITM)と呼び(Mizumori et al., 1987; Sangha et al., 2003; Stough et al., 2006; Sutton et al., 2001)、その後に形成される記憶は(1)24時間保持されるLTM、(2)48時間以上保持されるCLTMとされる(Rosenzweig et al., 1993)。LTMとCLTMの形成にはタンパク質の新生に加えて、遺伝子発現の変化が起こることが必要と考えられている(Abraham et al., 2008; Mizumori et al., 1987; Sangha et al., 2003)。しかし、記憶形成過程の間に必要なタンパク質合成を促し、記憶を固定化するために、特定のシナプスの形態変化にタンパク質合成が必要であるかは証明されていない。記憶強化の要因として起こるであろう、タンパク質合成とシナプスの形態変化を区別することはできないが、これまでの研究(Esposito et al., 2003)から、タンパク質の新生や遺伝子発現による記憶の固定化の過程には少なくとも2つの時期があるとが考えられている。

LTM形成時の必要とされるタンパク質新生には条件づけ直後(Davis et al., 1984)あるいは数時間後(Epstein et al., 2003; Takahashi et al., 2013; Takigami et al., 2014c)といった始動が異なる2つの期間が存在することが示されている。この点について問題提起したのがFulton et al. (2005)によるモノアラガイの1回の組刺激での味覚嗜好条件づけを用いて行った研究結果である。彼らの行った条件づけは嗜好性の味覚条件づけで、口の周りを軽く接触した後、シヨ糖を与えるもので、CSが接触刺激、USがシヨ糖となっており(Fulton et al., 2005)、本研究とは異なっている。モノアラガイにおいて条件づけ後に起こるタンパク質新生には、10分から1時間の範囲の期間が重要であると示唆された(Fulton et al., 2005)。条件づけ後45分でのCキナーゼ活性化の処理が記憶獲得のために重要であるとする本研究結果は、これらの

知見と一致している。さらに、Fulton et al. (2005)は条件づけ 10 分後に転写阻害薬である actinomycin D 及び、翻訳阻害薬である anisomycin の投与により LTM 形成が阻害されることを示した。本研究は条件づけ後 1 時間の範囲で C キナーゼ活性化剤の投与が記憶形成を強化することを示した。したがって、CLTM 形成は DNA からの転写後、C キナーゼの活性化と mRNA の翻訳による新規タンパク質の合成を必要とすると考えてもよいであろう。一方、Fulton たちの研究では actinomycin D、あるいは anisomycin を動物体内への注入によって阻害しているため、それら薬剤の影響から直ちに回復することはない。その為、薬剤の影響から回復するまでの時間内全ての転写及び、翻訳を阻害してしまう為、時間的考察は困難であることを問題点として提起したい。C キナーゼのような記憶形成の最初期に活性化される酵素の時間的な調査は活性化剤（ブライオスタチン）と不活性化剤(Ro-32)の双方を使用することで可能であると考えられる。これは、C キナーゼが記憶形成の初期に活性化することで記憶形成プロセスを開始するスイッチのような役割を持つ為、ブライオスタチン処理による C キナーゼの活性化効果が STM、ITM、LTM とする記憶形成に顕著に表れる。従って、最初期に誘発される細胞内事象の時間的考察が容易である。

条件づけ後のブライオスタチン処理によって誘発された C キナーゼのリン酸化と新規タンパク質合成が LTM 形成に重要であるとする仮説は、ウミウシにおける古典的条件づけによる同様の研究結果によって支持される(Alkon et al., 2005; Kuzirian et al., 2006)。ウミウシによる記憶形成は anisomycin と C キナーゼ阻害剤である Ro-32 によって阻害された(Alkon et al., 2005; Kuzirian et al., 2006)。従って、結果として、モノアラガイとウミウシという 2 種の腹足類において、記憶形成時の C キナーゼリン酸化と新規タンパク質合成の役割が確認された。一方、モノアラガイにおける記憶形成時の新規タンパク質新生の役割については本章で問題点を提起した actinomycin D、あるいは anisomycin のような不活性化剤を使用せずに新規タンパク質合成の役割について研究を進める必要がある。

図、表と図、表の説明

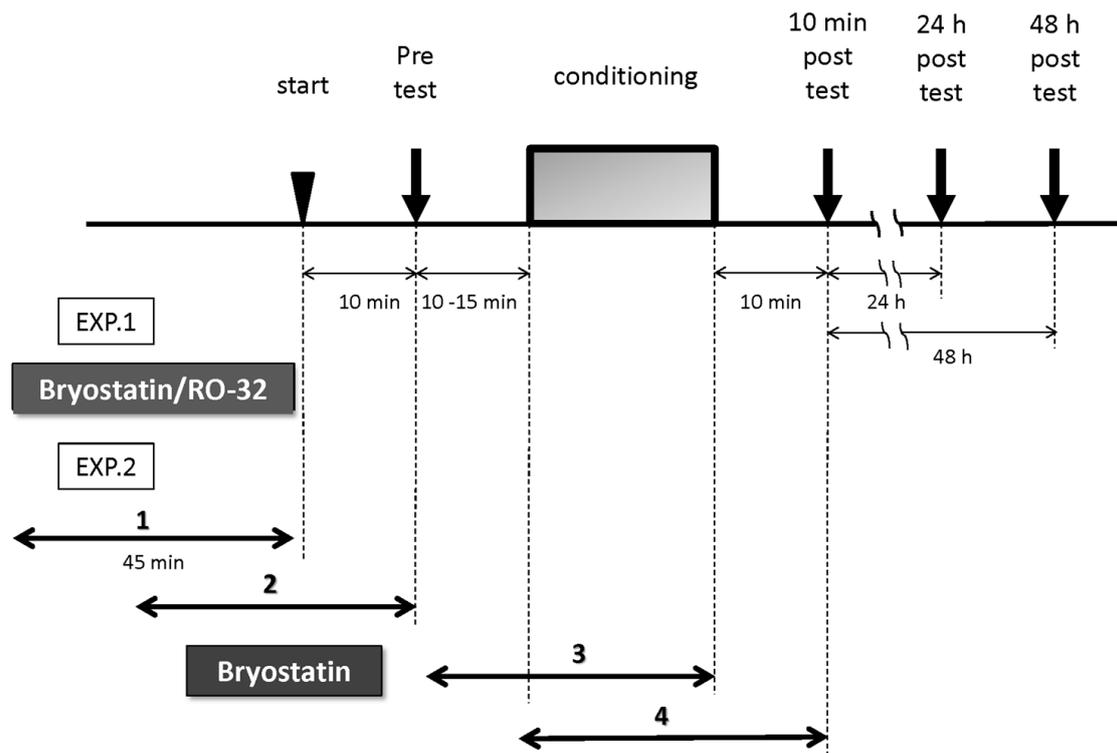


Fig. 3-2-1 味覚嫌悪条件づけプロトコル

モノアラガイは10分間装置内で自由に行動させ環境に慣れさせた後、Pre TestとしてCS (100mM ショ糖)を与え1分間の咀嚼回数を計測した。Pre Test後、10~15分間静置した後に組刺激を行った。CSとUS(接触刺激)を組刺激(5回、10回または、20回)として提示した。Post-Testとして10分後、24時間後、48時間後にPre-Testと同様にCSを与え咀嚼回数を計測し、Pre-Testと比較した。実験1、実験開始前のブライオスタチン(0.5ng/ml)またはRo-32 (80nM)処理の効果。ブライオスタチン(45min)、Ro-32 (20min)で処理した。ブライオスタチンとRo-32の双方を使用した場合はブライオスタチン処理(45min)後、Ro-32処理(20min)を行った。また処理の順序を逆転させた場合についても処理時間では同一とした。実験2、ブライオスタチン処理時点の影響。条件1はブライオスタチン処理実験前(実験環境への順応前)、条件2は条件づけ開始直前(組刺激提示前)までに、条件3は条件づけ試行終了時に45分間のブライオスタチン処理が完了するようにした。条件4はPre-Test 10minテスト直前にブライオスタチン処理を完了するものとした。以上4つの時点においてブライオスタチン処理(0.5ng/ml, 45min)を行った。

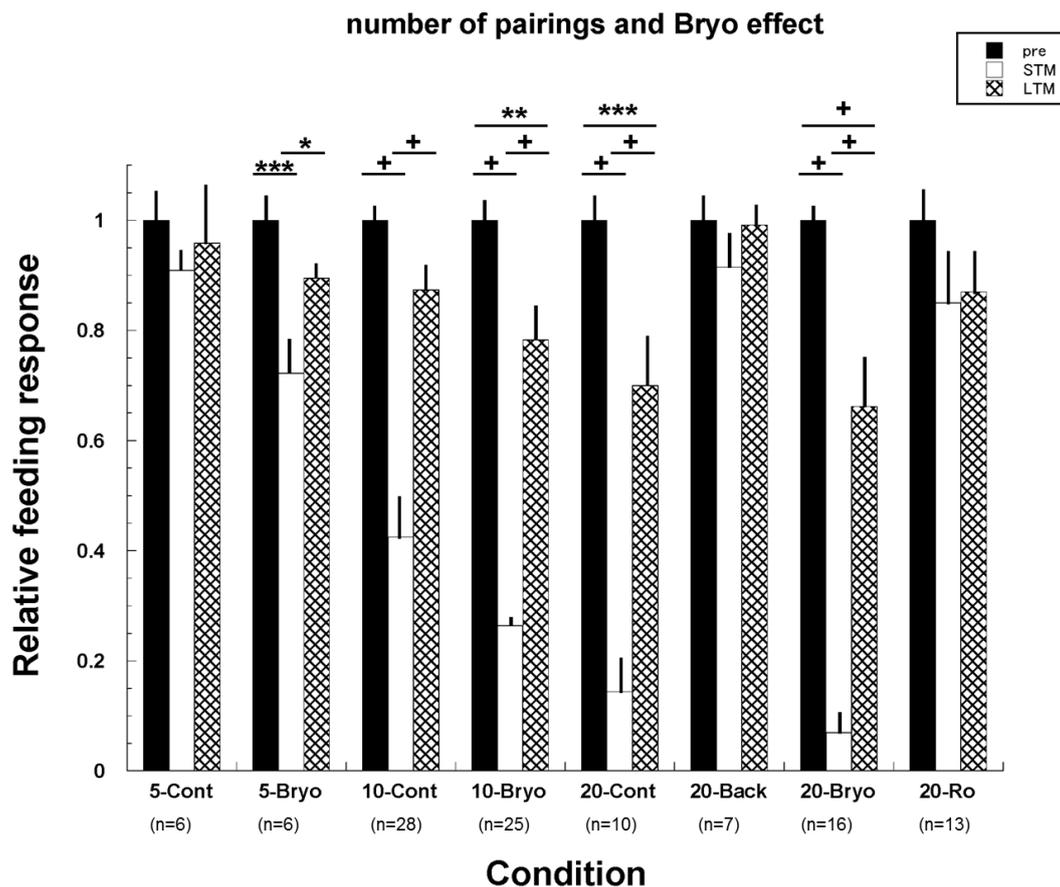


Fig. 3-2-2 組刺激回数(5、10、20回)とブライオスタチン処理が記憶形成(STM、LTM)に及ぼす効果

STM と LTM の評価は、Pre-Test と比較した。また、STM は Post-Test 10min、LTM は Post-Test 24h で評価した。咀嚼回数は Pre-Test の平均値を 1.0 として正規化して示した。ブライオスタチン処理を行った場合を除き、5 回の組刺激では STM を形成しなかった。10 回の組刺激では STM が形成され、ブライオスタチン処理によって LTM まで形成された。20 回の組刺激では、STM、LTM がブライオスタチン処理に関わらず形成され、逆手順 (20-Back)における組刺激では STM、LTM 共に形成されなかった。また、組刺激前の Ro-32 処理 (20-Ro)により、STM、LTM が形成されなかった。Fig. 3-3-3 に 20-cont 及び 20-Ro の各個体のデータ分布を図で示した。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; + $p < 0.0001$)

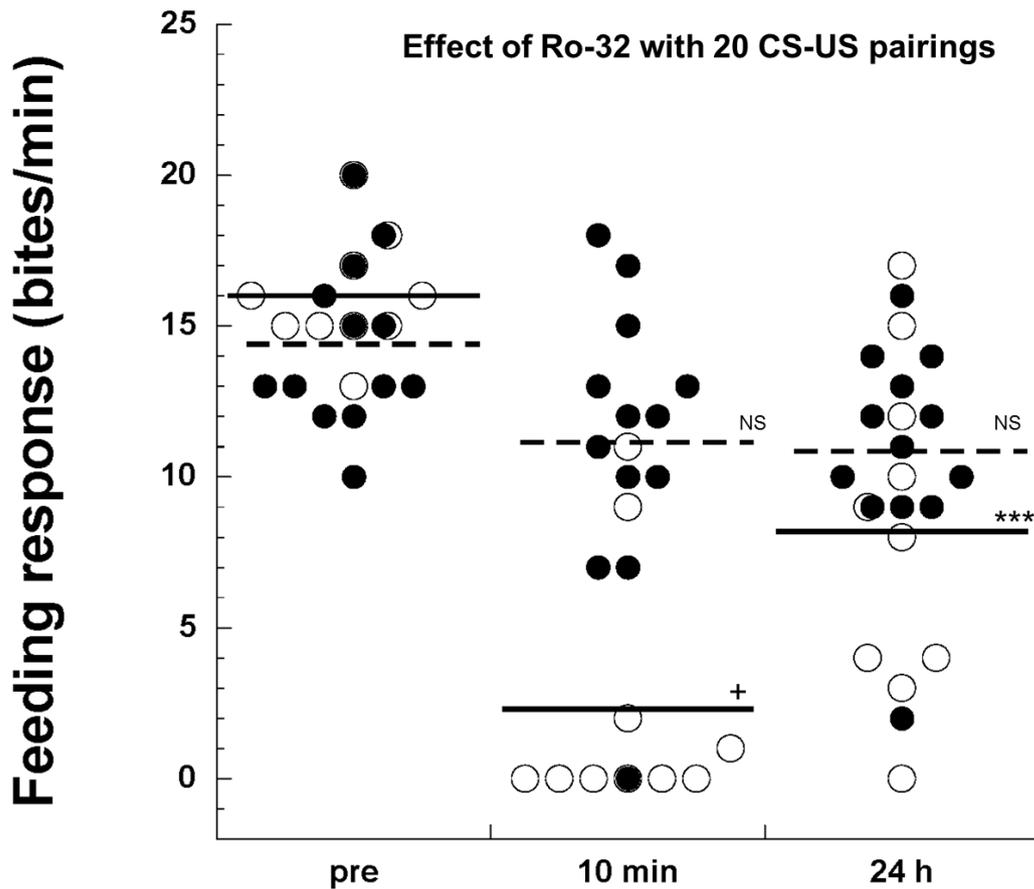


Fig. 3-2-3 20回の組刺激時のRo-32の影響

Fig. 3-2-2における20-contを白丸、20-Roを黒丸で個体ごとの咀嚼回数を示した。棒線は20-contの平均値、点線は20-Roの平均値を示す。20-contにおいて、Pre-Testと比較して10分後($^+p < 0.0001$)、24時間後($^{***}p < 0.001$)にSTM、LTMが観察されたが、Cキナーゼ抑制剤(Ro-32)の処理により、20回の組刺激による条件づけが抑制されSTM、LTM共に形成されなかった。

(NS: not significant, $^{***}p < 0.01$, $^+p < 0.0001$)

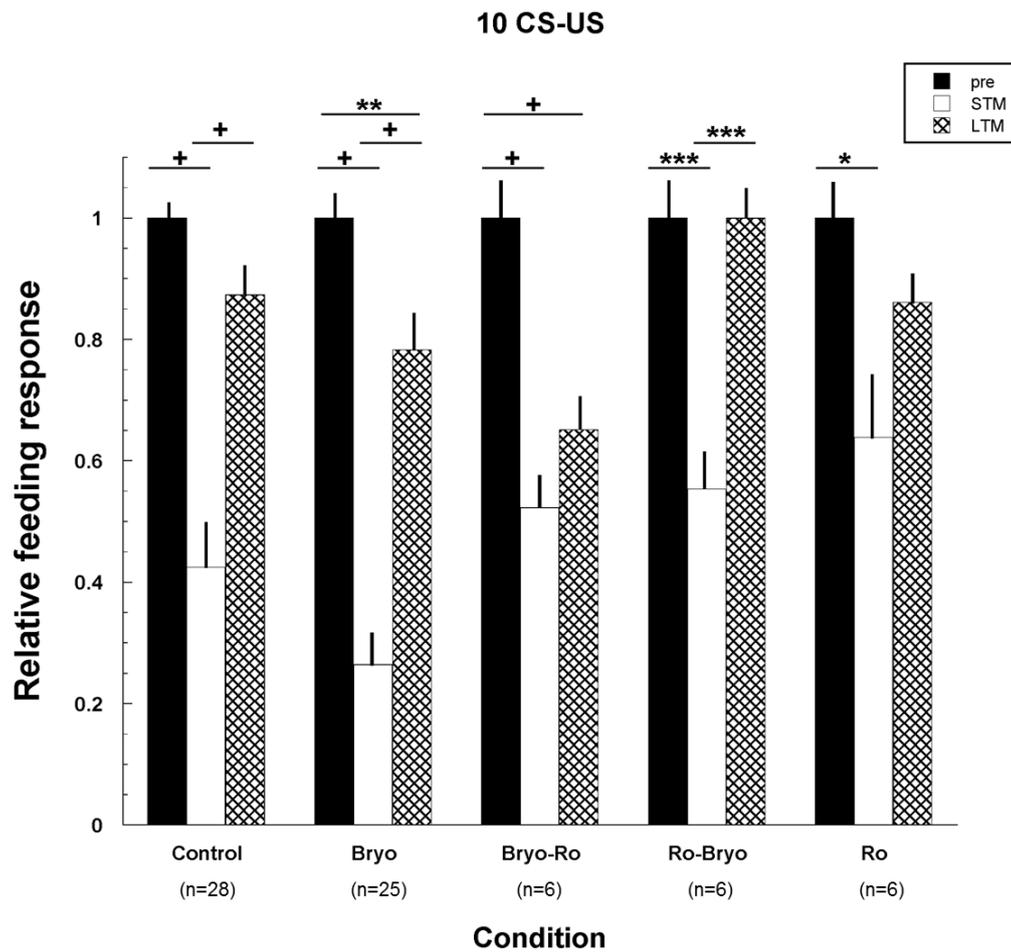


Fig. 3-2-4 味覚嫌悪条件づけにおける C キナーゼの役割

Pre-Test の平均値を 1.0 として正規化したデータを示した。10 回の組刺激による各群において C キナーゼ活性化剤(ブライオスタチン)及び/または、抑制剤(Ro-32)の効果を Post-Test 10min (STM)と Post-Test 24h (LTM)として調査した。LTM はブライオスタチン処理及び、Bryo-Ro で処理された群において観察されたが、Ro-Bryo の順番で処理した群及び Ro-32 で処理した群そして対照群において形成されなかった。一方、STM については程度の違いはあるもののいずれの群でも形成が観察された。 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, + $p < 0.0001$).

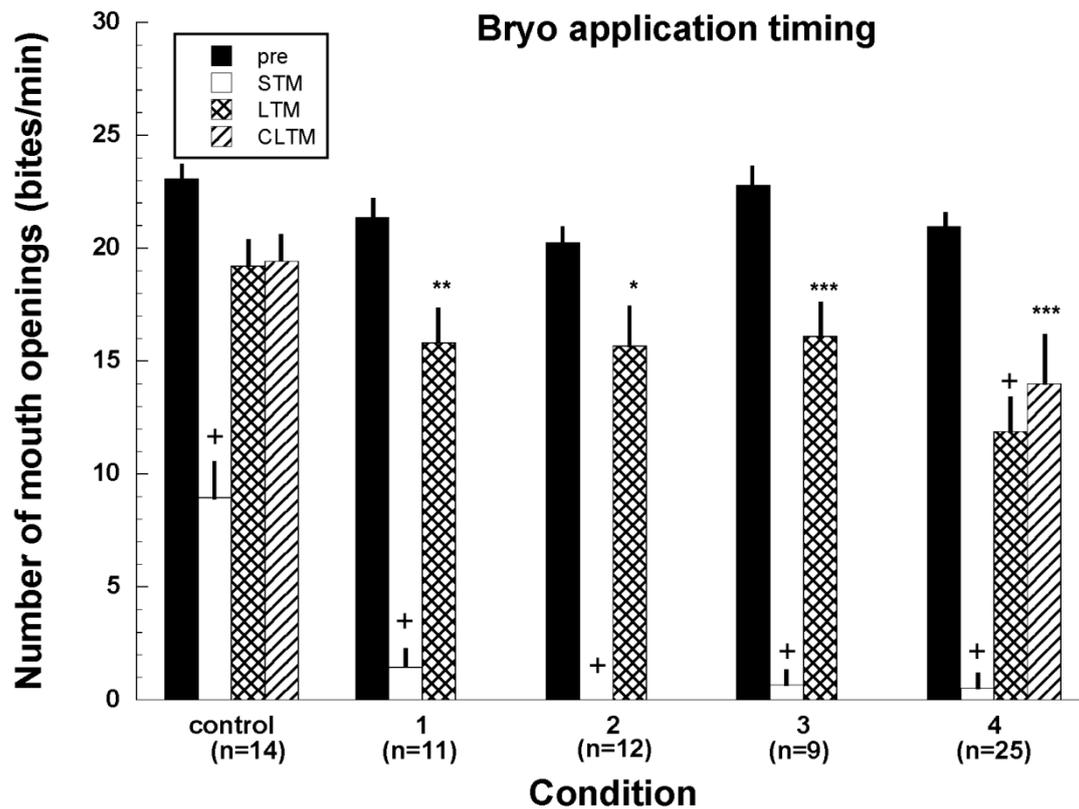


Fig. 3-2-5 ブライオスタチン処理のタイミングと記憶形成

データは咀嚼回数の平均を示した。条件 1-4 は Fig. 3-2-1 に示したプロトコルでブライオスタチン処理を実施したことを示し、処理のタイミングが今回調べた範囲では STM、LTM の形成に無関係であることが示されている。なお CLTM の形成が条件 4 において観察されたが他の条件では実験していない。(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, + $p < 0.0001$).

Table 3-2-1

Repeated-measures ANOVA and Scheffe's *F* post hoc test, *F* values, and probabilities among PKC-related behavioral measures.

Number of CS-US	Condition	F/p	Pre vs. STM	Pre vs. LTM	LTM vs. STM
5	Control	1.417/0.273	NS(0.273)	NS(0.751)	NS(0.917)
	Bryo	11.531/0.001	0.001	NS(0.231)	0.032
10	Control	39.472/<0.0001	<0.0001	NS(0.182)	<0.0001
	Bryo	61.064/<0.0001	<0.0001	0.009	<0.0001
20	Control	32.836/<0.0001	<0.0001	0.0009	<0.0001
	Bryo	95.571/<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

NS: not significant.

STM: short term memory (Post-Test 10min); LTM: long term memory(Post-Test 24h); CLTM: consolidated long term memory(Post-Test 48h).

Table 3-2-2

Memory enhancement effects of bryostatin in terms of CS-US repetition number.

CS + US	Control	+Bryostatin
5 Pairings	No	STM
10 Pairings	STM	STM, LTM
20 Pairings	STM, LTM	STM, LTM, CLTM

Table 3-2-3

Scheffe's *F* post hoc test statistical significance levels for behavioral changes induced by Bryo and its inhibitor Ro-32 prior to 10 paired CS–US associative conditioning trials.

<i>Control</i>			
Control	Pre	STM	LTM
Pre		<0.0001	NS(0.1821)
STM			<0.0001
<i>Bryo</i>			
Bryo	Pre	STM	LTM
Pre		<0.0001	0.0091
STM			<0.0001
<i>Bryo → Ro32</i>			
Bryo-RO	Pre	STM	LTM
Pre		<0.0001	<0.0001
STM			NS(0.111)
<i>Ro32 → Bryo</i>			
Ro-Bryo	Pre	STM	LTM
Pre		0.0002	NS(0.9587)
STM			0.0003
<i>Ro32</i>			
RO	Pre	STM	LTM
Pre		0.0148	NS(0.4522)
STM			NS(0.1519)

Table 3-2-4

Scheffe's *F* post hoc test probability significance levels among behavioral measures obtained by differences in the application time-window for Bryo within the training regimen. Conditioning was performed by 20 paired CS-US presentations in each condition.

<i>Control</i>				
Control	Pre	STM	LTM	CLTM
Pre		<0.0001	NS(0.0586)	NS(0.0702)
STM			<0.001	<0.001
LTM				NS(0.9977)
<i>Condition 1</i>				
Condition 1	Pre	STM	LTM	
Pre		<0.0001	0.0032	
STM			<0.0001	
<i>Condition 2</i>				
Condition 2	Pre	STM	LTM	
Pre		<0.0001	0.0246	
STM			<0.0001	
<i>Condition 3</i>				
Condition 3	Pre	STM	LTM	
Pre		<0.0001	0.0002	
STM			<0.0001	
<i>Condition 4</i>				
Condition 4	Pre	STM	LTM	CLTM
Pre		<0.0001	<0.0001	0.0005
STM			<0.001	<0.001
LTM				NS(0.6093)

第 3 章

3.3. 記憶の強化は温度に依存する

3.3.1. 目的

条件づけによる記憶をその成立機序により STM から ITM, LTM と分類したが、それぞれに関わる分子機構は異なり、当然関与する化学反応は違う。このことは、それぞれの記憶が形成されるために効果的に CS、US を提示しつつ、化学反応が完了するのに十分な時間を要することを意味している。それがモノアラガイにとっては 1 日に 20 回の組刺激が与えられている時間である可能性がある。19 世紀までの学習、記憶の心理学的、神経科学的研究では、このような時間的要素を考慮して刺激提示することはなかった。しかし、19 世紀後半から 20 世紀初頭にかけて、心理学の分野ではエビングハウスにより時間をかけて学習する分散学習が、一気に学習する集中学習より、長期間記憶を維持できると提唱されてきた(Ebbinghaus et al., 1885)。なお、分散学習とは条件刺激(CS)と無条件刺激(US)を組刺激とするが、組刺激間隔を時間的に切り離れた学習を言う。加えて、分散学習は、組刺激間隔を時間的に切り離さない集中学習より効果的であることが知られている(ガルシア効果; Garcia et al., 1974)。前述した光を手掛かり刺激、体動揺を無条件刺激とする視—前庭干渉による条件づけにおいて、モノアラガイで集中学習と分散学習について検討され、集中学習と分散学習では、分散学習の方が長期間記憶を保持できることが示されている(Sakakibara et al., 1998; Takigami et al., 2014c)。

本研究では、STM から LTM 成立の作業仮説を念頭に置き、それぞれの記憶が成立する過程で関わる化学反応を想定しながら条件づけを行えば、より効率的に学習獲得、記憶成立が図られるはずであると考え実験を組み立てた。具体的には、分散学習により一層強固な LTM が形成されることを詳述することで、以下 5 点について検討した。第 1 に合計 20 回の組刺激を複数日で行う分散学習において、より効果的に記憶を保持する 1 日の組刺激回数を調査した。第 2 に味覚嫌悪条件づけを 1 日に 5 回の組刺激として 4 日間行う分散学習とし、1 日の学習直後の冷却により記憶が阻害されるか調査した。第 3 に冷却による記憶の阻害が冷却のタイミング(1 日の組刺激後 0~180 分)によって、どう影響されるか調査した。

第 4 に冷却による記憶阻害が可逆的であるか、阻害状態から再学習可能かによって評価した。第 5 に条件づけ前にブライオスタチン処理を行い、更に条件づけ後に冷却阻害を行うことで C キナーゼの活性化によって媒介されるリン酸化が冷却阻害を受けて、STM 形成過程の分子機構へどのように関与するか調査した。

3.3.2 方法

3.3.2.1. 冷却阻害

汲み置き水を入れた 500ml ビーカーを氷冷し、ビーカー内の水温を 5°C で維持し冷却装置とした。条件づけ後のモノアラガイを冷却装置に入れその状態で 10 分間維持した。冷却からの回復は室温で維持した味覚嫌悪条件づけ実験装置内で行った。また、冷却後の咀嚼行動の観察は室温で維持した味覚嫌悪づけ実験装置内で 2 分間の静置後に行い、咀嚼回数を測定した。なお、通常モノアラガイは 2 分以内に咀嚼行動を再開した。

3.3.2.2. 実験 1—分散学習、集中学習後の冷却阻害

20 回の組刺激を 1 日 (1 日に 20 回の組刺激(1D×20))、2 日 (1 日に 10 回の組刺激を 2 日間(2D×10))、4 日 (1 日に 5 回の組刺激(4D×5)) に分けて条件づけを行い分散学習による記憶形成の効果について検討した。続いて、冷却阻害が記憶形成に干渉するか調査するために 4D×5、2D×10、1D×20 で条件づけを行い、各日の条件づけ直後に冷却阻害を行った。

3.3.2.3. 実験 2—記憶の形成プロセス

実験 2 では冷却が STM と LTM を阻害する時期を決定するために各日の条件づけ後に冷却するタイミングを変えた。具体的には各日の条件づけ後にモノアラガイを冷却するタイミングは Fig. 3-3-1 で示すように 4、7、10、15 分後及び、180 分後と設定し、STM、LTM、

CLTM が形成されるかを確認することで評価した。

モノアラガイは条件づけ後の其々のタイミングで以降 10 分間冷却した後に CS に対する咀嚼行動から記憶を評価した。記憶は Pre-Test、Post-Test 10min、Post-Test 24h、Post-Test 48h とする 3 回以下の Memory Test により評価した。条件づけ後 10、15、180 分遅れて冷却を行った場合については Post-Test 10min は冷却からの回復後に行った。これら実験パラダイムは Fig. 3-3-1 に図示した。

3.3.2.4. 実験 3—冷却阻害の可逆性

実験 3 は冷却阻害による記憶阻害の可逆性を調査するために実施した。つまり、冷却阻害を行い、記憶が形成されなかったと判断されたモノアラガイが、その後、通常の条件づけでは記憶形成が可能であるか調べた。対象として 4D×5 の組刺激条件で各日の条件づけ後 0 分に冷却した動物を用いた。この動物に対して後日、4D×5 の条件で直後の冷却はせずに条件づけを行い、学習行動が観察できるか検討した。

3.3.2.5. 実験 4—C キナーゼ活性化後の冷却阻害による

STM 形成に及ぼす影響

冷却阻害下において C キナーゼの活性化に依存して STM が形成することを調査するため、組刺激を 4D×5 で行ったモノアラガイを各日の条件づけ直後に冷却した。4D×5 の 4 日目の Pre-Test 前にブライオスタチンで 45 分間処理し、条件づけ後の冷却後に Post-Test 10min、Post-Test 24h 及び、Post-Test 48h を測定することで STM と LTM を評価した。

3.3.3. 結果

3.3.3.1. 実験 1—分散学習、集中学習の効果と冷却阻害の影響

26 匹の naïve モノアラガイに合計 20 回の組刺激を与えた。モノアラガイは 1) 1 日に 20 回の組刺激を行った群(1D×20:n=9)、2) 1 日に 10 回の組刺激を 2 日間行った群(2D×10:n=8)、3) 1 日に 5 回の組刺激を 4 日間行った群(4D×5:n=9)、の 3 群に其々振り分け、其々の群の 20 回の組刺激後、STM と LTM を評価し、結果を Fig. 3-3-2A, C 及び Fig. 3-3-3A に示した。

LTM は 1 日に 5 回の組刺激を 4 日間与えた群(4D×5)においてのみ観察された。つまり 4D×5 群の動物のみが CS 提示に対して Pre-Test と比較して Post-Test 24h で咀嚼回数が有意に減少した ($p<0.05$)。一方、STM は全ての群で観察されたが、4D×5 群以外の 2 群については Post-Test 24h において有意な咀嚼回数の減少は見られず LTM は形成されなかった。

全 3 群(各 8 匹)のモノアラガイにおいて記憶形成への冷却阻害(Fig. 3-3-2B, D, Fig. 3-3-3C) の効果を検討した。各日最後の組刺激直後に冷却阻害を行った結果、Fig. 3-3-2B、2D 及び、Fig. 3-3-3C に示されるように全 3 群の STM 及び LTM の形成が阻害された。

続いて、4D×5 群を用いて、LTM の形成(Fig. 3-3-3A)の記憶固定化プロセスについて検討した。Fig. 3-3-3A の LTM が形成される過程として、Post-Test 10min の咀嚼回数の減少が Pre-Test と比べて統計的に有意でなかった場合でも、Post-Test 10min の咀嚼回数は Pre-Test と比べて常に少なかった。さらに、翌日の Pre-Test (前日の Post-Test 24h) の咀嚼回数は 2 日目を除き、常に前日の Post-Test 10min より高い値を示した。これは動物が忘却を示しながらも前日の学習の効果が残っていることを示している。STM は初日に形成され、毎日の組刺激によって STM は維持しつつ、4 日目において LTM の形成が観察された。Fig. 3-3-3B に示されるグラフは味覚嫌悪条件づけにおける CS と US の手順を逆手順 (Backword) とした結果であり、逆手順条件づけでは US と CS の連合は起こらず咀嚼回数の減少をもたらさないことを示している。各日の 5 回の組刺激後の冷却阻害は各日の組刺激提示後最初期に

おける記憶の形成過程を阻害することで、STM 及び、LTM 形成を停止させたと考えられた (Fig. 3-3-3C)。

3.3.3.2. 実験 2—記憶の形成プロセスの冷却タイミングによる検討

実験 1 において、STM と LTM の形成は各日の組刺激直後の冷却によって阻害されることが観察された。続いて、冷却阻害によって記憶形成が阻害されるタイミングを観察することで記憶形成における固定化プロセスの重要な時期の決定を試みた。各日の組刺激後、冷却を行う時点は、各日の組刺激後、4 分、7 分、10 分、15 分、180 分とした 5 群に分けた(n=8) (Fig. 3-3-1)。その実験結果を Fig. 3-3-4 に示した。組刺激後 4 分及び 7 分で冷却を行った群は LTM を形成しないが STM は形成した(4min delay: 1D-pre vs. 1D-post $p=0.0084$, 2D-pre vs. 2D-post $p=0.0035$; 7 min delay: 2D-pre vs. 2D-post $p=0.0063$)。組刺激後 10 分及び、15 分に冷却阻害を行った群では STM、LTM は形成され、Fig. 3-3-4D、4E で示した LTM へと続く咀嚼回数の減少推移は Fig. 3-3-3A と比べて緩徐を示す傾向が観察された。最後に、組刺激後 180 分に冷却を行った群においては STM、LTM 共に形成されなかった。

各日最後の組刺激後 180 分の冷却を行った群では、STM、LTM が形成されず、さらに Fig. 3-3-4 の他の群より個々の個体のばらつきが小さかった(Fig. 3-3-4F)。これにより、各日の組刺激後 180 分の冷却処置が STM 及び LTM を阻害するのに十分に効果的であったと結論づけた。

3.3.3.3. 実験 3—冷却阻害の可逆性

実験 3 では記憶を急速冷却によって阻害したことで記憶が形成されなかったモノアラガイにおいても記憶形成の能力があるか検討した。この実験において(Fig. 3-3-5A)、1 日に 5 回の組刺激を 4 日間行い、各日最後の組刺激直後に冷却を行った群、すなわち 4 日目まで

には記憶は形成されていない群(Fig. 3-3-4A)にその後4日間は冷却しないで条件づけを行った。その結果、4D×5群と同様の条件づけを追加して行くと、STMとLTMの形成が観察された。以上より、冷却による記憶忘却は記憶形成過程の分子機構を停止できるが、この阻害効果は不可逆的なものではない。このような意味で可逆的と言えるものであった。

3.3.3.4. 実験4—STM形成時のCキナーゼの関与

条件づけの記憶がCキナーゼの活性化後に固定化できるか調べるためにCキナーゼ活性化剤であるブライオスタチンの投与を以下の条件づけ手順で行った(n=6)。4D×5群と同様に組刺激を与え、1日から3日目の最後組刺激直後に冷却したところ、STM、LTMはいずれも形成されなかった。続いて、4日目の条件づけ開始前にブライオスタチンにより処理し、組刺激直後に冷却を行った群では、5回の組刺激によってSTMがFig. 3-3-5Bに示すように冷却阻害を受けても形成された。しかし、LTM及びCLTMの形成は観察されなかった。

3.3.4. 考察

本項の実験において以下の5つの結果を得た。1) 分散学習はLTMを形成させる上で効果的である。2) 組刺激後、遅延時間0分での冷却阻害はSTM、LTMの双方を阻害する。3) 遅延時間10分以内の急速冷却はLTMの形成を阻害する。4) 遅延時間180分の急速冷却はLTM形成を阻害する。5) 冷却阻害によりもたらされる阻害効果は不可逆的なものではない。

3.3.4.1. LTM形成のメカニズムとそれに対する冷却の影響

記憶の固定化期間の中で学習直後に分子プロセスの変更を受けることは記憶形成の阻害をもたらす。シナプス可塑性の長期に渡る固定化プロセスとLTMの固定化プロセスにおいて重要な遺伝子活性は、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor 2)や、初期成長応

答遺伝子 1 (early growth response gene 1)、CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (CCAAT/enhancer binding protein)、c-fos 遺伝子、c-jun 遺伝子などの前初期遺伝子の活性化である(Murakami et al., 2013; Anokhin et al., 1991; Chen et al., 2011; Guzowski et al., 2001; Jones et al., 2001; Taubenfeld et al., 2001)。Murakami et al., (2005) により、クローニング、塩基配列が決定された前初期遺伝子の一つである CCAAT/enhancer binding protein (Azami et al., 2006)と、Murakami et al. (2013)により調査された軟体動物インスリン関連ペプチド(MIP : Molluscan Insulin-related Peptide)がモノアラガイ味覚嫌悪条件づけの記憶固定への関与が示唆されている(Azami et al., 2006; Murakami et al., 2013)。

新規のタンパク質合成が LTM の形成には不可欠であり、1)トレーニング直後(Sutton et al., 2001)、2)トレーニングの数時間後(Epstein et al., 2003)、この二つの期間において、可塑的変化に対する感受性が高いことが想定される。また、Fulton et al. (2008)は条件づけ直後に冷却阻害を適用した場合に限り、LTM の形成を阻害することを味覚嗜好条件づけにより示した (Fulton et al., 2008)。しかし、Fulton et al. (2005)の研究において使用されたタンパク質合成阻害剤、mRNA 転写阻害剤の効果は不可逆的なため記憶形成の時期を正確に議論することはできないと多くの研究者は考えている(Sangha et al., 2003)。一方、本項において示したように、冷却阻害の効果は記憶形成に対して不可逆的なものでないことから、記憶の形成過程における感受性期を論じるには好適な方法である。

モノアラガイにおいて、オペラント条件づけ直後 (30 秒以内) に冷却し、記憶の固定化阻害、更にその後記憶の再固定化を行った場合についても、モノアラガイの状態に悪影響を及ぼさないことが報告されている(Sangha et al., 2003a,b,c)。本項における LTM 形成阻害の為の冷却阻害は、最後の組刺激の後 10 分以内に適用しなければ記憶をブロックすることはできなかった。肺呼吸を抑えるようにするオペラント条件づけの one-trial training において、ITM の形成直後に冷却を行うことで記憶形成分子の情報伝達を阻害した実験手順では、LTM の形成を抑制したとの報告がある(Parvez et al., 2005)。加えて、この one-trial training の直後

及び、120分から180分以内での麻酔薬であるケタミンの投与を行うことでLTMは阻害された(Martens et al., 2007)。これら結果はLTMが阻害を受けやすい時期という点で本項の実験結果と一致しており、記憶形成期間中には阻害に影響を受けやすい異なった少なくとも2つの時点が存在することを示していると考えられる。

従って、本項の冷却阻害を利用した方法はこれまでの研究結果(Fulton et al., 2008; Sangha et al., 2008)に矛盾することなく、STM形成を阻害する効果が持つことが裏付けられた。0分以外の遅れ時間の冷却阻害実験(4, 7, 10, and 15 min delay)においてSTMの形成が観察されたが、冷却阻害時点4、7分でLTMは形成されなかった。結果として、記憶の固定化プロセスが条件づけ後10分までの時点で進行する可能性が高いと考えられる。この間に冷却阻害の影響で停止するか、LTM形成のための代謝プロセスや、高分子の合成速度の減速により記憶形成が阻害される可能性が高いと推測された。実際に各日の組刺激提示後に冷却することによってSTMとLTMは形成されなかった(Fig. 3-3-4F)。

1日に5回の組刺激を4日間行う分散学習において、最終日の組刺激後180分に冷却することにより記憶形成が阻害され記憶が固定化されなかった。この場合、STMは一旦形成されると短期間残留するが、最終日の最後の組刺激と180分後の冷却によりPost-Test前に記憶が忘却された為に観察できなかったと考えた。この実験においてLTMの形成が明白でなかった理由を考察することは重要である。それは、記憶の固定化期間は各日の条件づけ10分後以降に形成される為である。以上より、高分子合成プロセスの減速、停止は、LTM形成の為のタンパク質合成を条件づけ後180分のITM中の冷却が介在した結果、遅延したものと示唆される。同様な現象は最近のモノアラガイの研究または、ウミウシ、アメフラシを使用した研究において報告されている。Marra et al. (2013)のモノアラガイ味覚嗜好条件づけのone-trial conditioningの研究結果では、条件づけ後10分、1時間、3時間の時点で記憶の形成が観察されるが、30分、2時間後の時点では記憶が忘却されたように観察されることが報告されている (Marra et al., 2013)。これらの記憶形成経過と感受性は、異なる分子

メカニズムを持つ記憶の形成経過段階の遷移過程の違いに依拠していると考えられた。

Crow et al. (2011) のウミウシを用いた研究では One-trial の In vitro conditioning において、条件づけ 30 分、3 時間後のタンパク質レベルの変化を二次元差分ゲル電気泳動で調べている。その結果、上記の時間経過の間に重要なタンパク質が検出されており、検出されたタンパク質は翻訳調節、細胞シグナル伝達、細胞骨格調節、代謝活性、タンパク質分解などの細胞機能に関与していた。アメフラシの冷却阻害を用いた研究では、行動レベル及び、電気生理学的に検討されており、それらの結果では記憶形成過程で引き起こされる神経細胞の形態的な変化、及びその結果、起きる行動レベルでの変化は観察されていなかった(Botzer et al., 1998; Sherff et al., 2004)。Botzer et al. (1998)の研究では味覚嫌悪条件づけが用いられており、この研究では LTM が条件づけ後 12~24 時間で形成されていたが、条件づけ後 4~12 時間の間において明白ではなかった(Botzer et al., 1998)。Botzer らは本研究とは異なる冷凍庫内に動物を入れるという記憶の急速冷却法を用いたが、行動実験結果には本研究と相違なく、STM 形成の阻害はなかった。従って、冷却による記憶形成過程への感受性は STM、ITM、LTM と形成される分子メカニズムで STM 形成から LTM 形成までの間に対応していると考えられる。

3.3.4.2. 記憶形成の初期過程

細胞レベルでの記憶形成は学習に関わる神経細胞のシナプスの形態変化によって形成されることが証明されており(Kandel et al., 2001; Staras et al., 1998; Fulton et al., 2008; Sunada et al., 2014)、特定の神経細胞の膜特性の変化は記憶形成の初期過程に関与する(Braun et al., 2011; Mozzachiodiet al., 2008)。ウミウシを使用した光と回転振動による古典的条件づけでは、長期間の K^+ チャネルの不活性化によって B 型視細胞の興奮性が変化する(Alkon et al., 1985,1987)。ウミウシへのブライオスタチンの投与はキナーゼ C 伝達経路を介して記憶形成を強化することが報告されている(Nelson et al., 1996)。

Epstein et al. (2003) がウミウシの古典的条件づけ（光 - 回転振動条件づけ）の研究において、ITM と LTM 形成の為に必要とされる新規タンパク質が条件づけ後 15 分以内と 60 分後に合成される為、2 段階の新規タンパク質合成が必要であると示唆しており (Epstein et al., 2003)、これは本研究によって見出された結果とタイミングとしてとてもよく一致している。本項では記憶形成が条件づけ 180 分後の冷却によって阻害されることを示した。このように、条件づけ後のある時点が形成過程において重要であると考えられた。本研究結果は、条件づけ後の新規タンパク質合成である一つの期間（180 分後）が記憶形成において重要であることを支持している。

図と図の説明

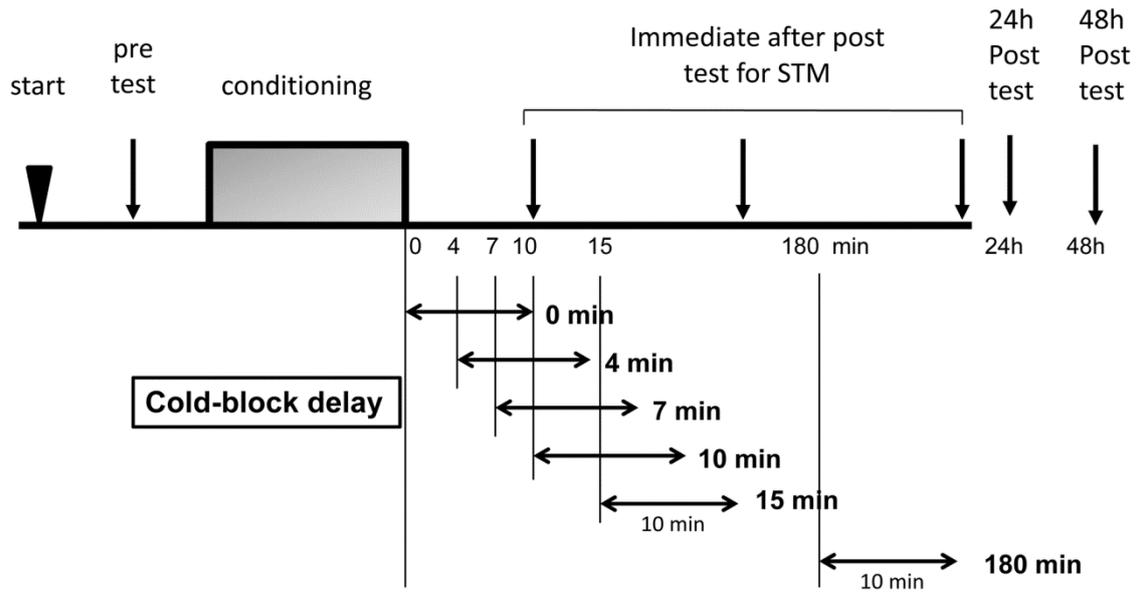


Fig. 3-3-1 モノアラガイ味覚嫌悪条件づけ1日の実験手順

モノアラガイは実験開始から10分間装置内の環境に慣れさせた後、1分間のショ糖(CS)に対する咀嚼回数を計測し、これをPre-Testとした。その10-15分後に組刺激(5回、10回、20回)を与える条件づけを行った。Post-Testは冷却した後10分後、24時間後及び、48時間後にPre-Testと同様にして計測した。冷却阻害方法は条件づけ直後(0分)、4分、7分、10分、15分、180分後にモノアラガイを氷水で冷やしたビーカーの中の水に入れて行った。そして、冷却阻害の効果はCSに対する咀嚼回数によって評価した。また、短期記憶(STM)は条件づけ後10分、長期記憶(LTM)は条件づけ後24時間及び、48時間として其々Post-Testによって評価した。

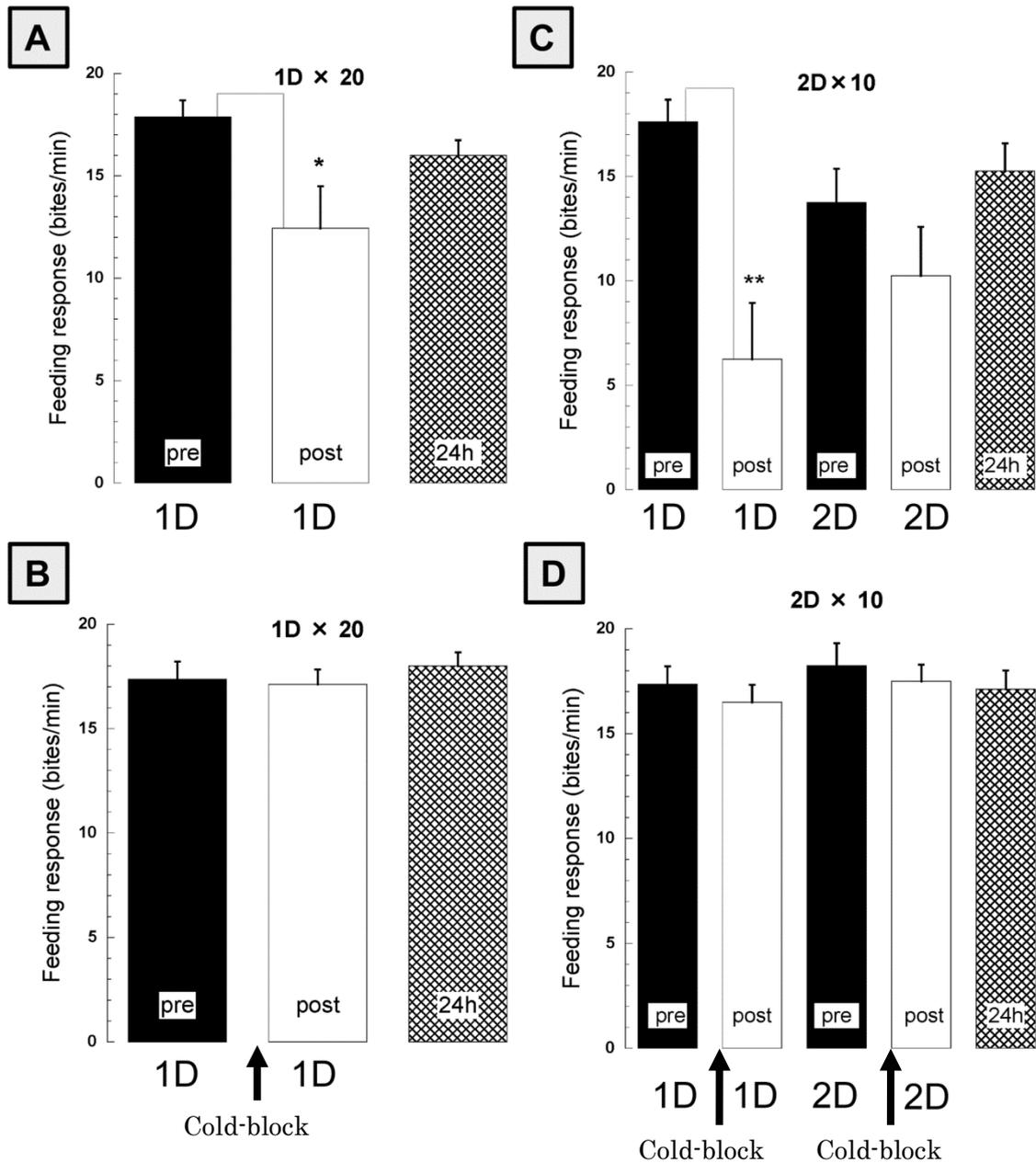


Fig. 3-3-2 冷却による記憶障害

各グラフにおいて、Pre-Test (Black bar)、Post-Test 10min (White bar)、Post-Test 24h (Cross-hatched bar)とし、各群のショ糖 (CS) に対する咀嚼回数の平均として示した。モノアラガイ(n=9)に1日に20回の組刺激を与えた群(A)。1D×20群ではSTMは形成されたがLTMは形成されなかった。また、各日の条件づけ直後の冷却によりSTM、LTMの双方が阻害された(n=8)(B)。1日に10回の組刺激を2日間に分散させて与えた群(C)。2D×10群においてもSTMは形成されたがLTMは形成されなかった。条件づけ直後の冷却によりSTM、LTMの双方が阻害された(n=8)(D)。データは平均値±標準誤差で示した。 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

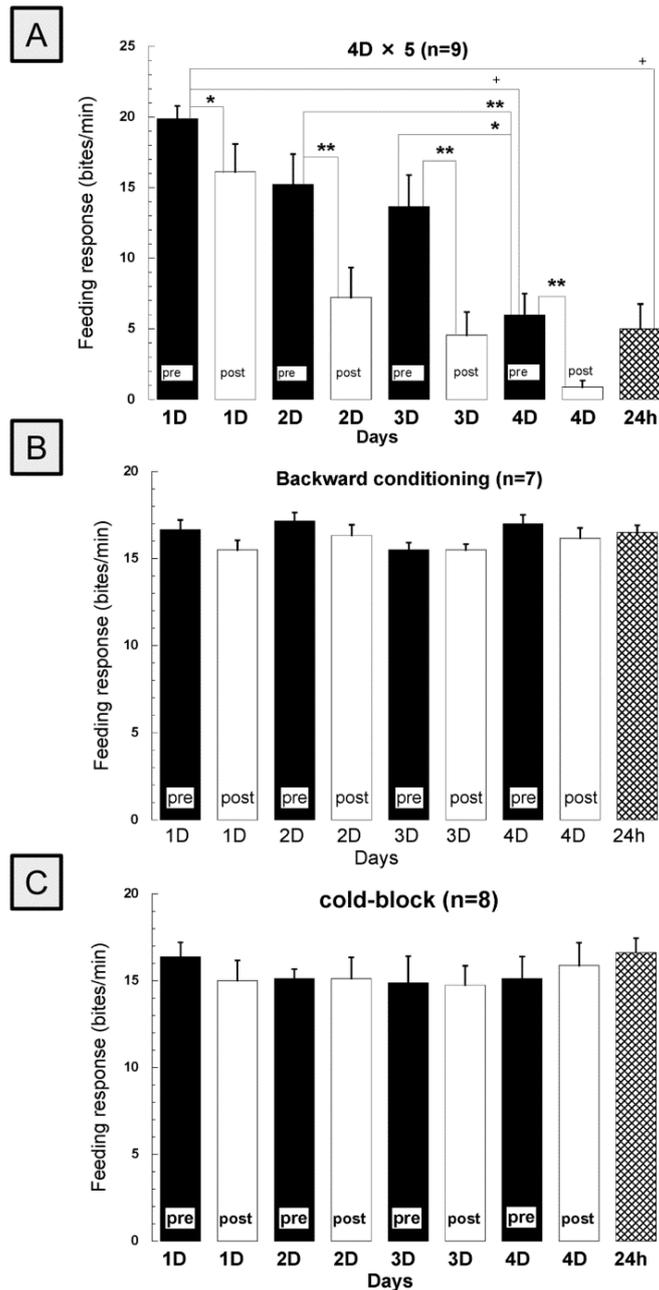


Fig. 3-3-3 冷却による記憶阻害 2

各グラフにおいて、Pre-Test (Black bar)、Post-Test 10min (White bar)、Post-Test 24h (Cross-hatched bar)とし、各群のショ糖 (CS) に対する咀嚼回数の平均として示した。モノアラガイ(n=7)に1日に5回の組刺激を4日間に分散させて与えた群(A)。4D×5群ではSTM、LTMの双方が形成された。組刺激においてCSとUSを逆手順(Backward)とした場合、記憶の形成は観察されなかった(n=7)(B)。また、各日の条件づけ直後の冷却によりSTM、LTMの双方が阻害された(n=8)(C)。repeated measures of ANOVA 検定による有意差の値は1D-Pre及び、各日のPreと比較した。データは平均値±標準誤差で示した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, + $p < 0.0001$).

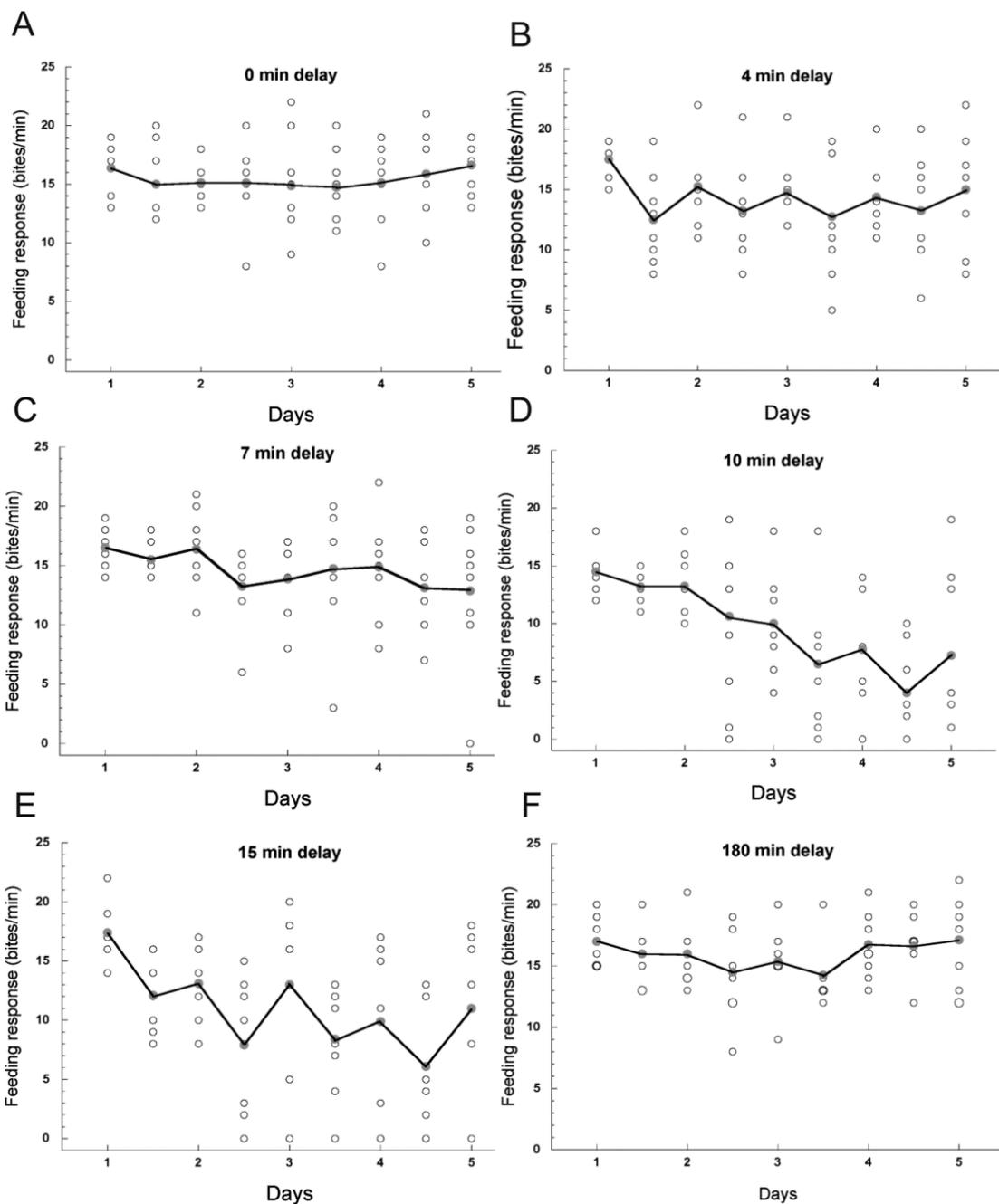


Fig. 3-3-4 冷却阻害を遅延させた場合の条件づけに対する効果

各グラフにおいて、折れ線は平均値、白丸は各個体の実測値として、Pre-Test, Post-Test は日内に示し、最初の値が Pre-Test、直後の値が Post-Test 10min として示される。各々のグラフは条件づけ後異なった時点で冷却したときの結果を示した。条件づけ後の冷却阻害時点(各群 n=8)は、A) 直後(0分)、B)4分、C)7分、D)10分、E)15分、F)180分後とし、条件づけは1日に5回の組刺激を4日間行う(4D×5)として、各日最後の組刺激後に設定したタイミングで冷却阻害を行った。

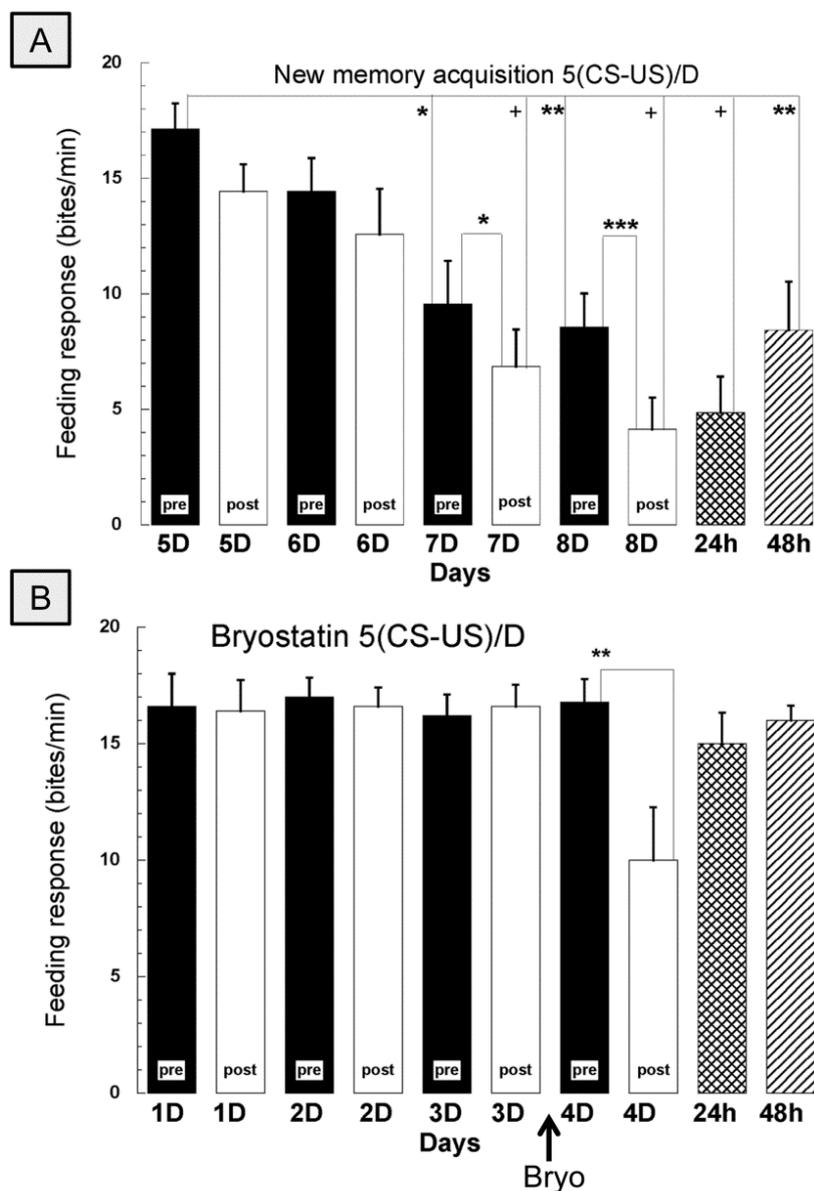


Fig. 3-3-5 冷却阻害後の再学習とCキナーゼ活性化の効果

各グラフにおいて、Pre-Test (Black bar)、Post-Test 10min (White bar)、Post-Test 24h (Cross-hatched bar)、Post-Test 48h (Hatched bar)とし、各群のショ糖 (CS) に対する咀嚼回数の平均として示した。再学習の効果(A)。モノアラガイ(n=7)に1日に5回の組刺激を4日間に分散させて条件づけ与えると共に、各日最後の組刺激直後に冷却を行い記憶を阻害させた群(Fig. 3-3-4)を更に1日に5回の組刺激を4日間与える分散学習により再学習を試みた。冷却によって記憶が阻害された群であるが再条件づけしたことでSTM、LTM、CLTMの形成が見られた。冷却阻害とブライオスタチンの効果(B)。4D×5群において各日で条件づけ直後に冷却阻害を行い、4日目Pre-Test前に45分間ブライオスタチンによって処理した。これにより4回目Post-Test 10minで咀嚼回数が有意に減少した。つまりSTMは形成されたが、LTM、CLTMは形成されなかった。データは平均値±標準誤差で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, + $p < 0.0001$ 。

第3章

3.4. 集中学習と分散学習の生理学的意味

3.4.1. 電気刺激を無条件刺激とした

味覚嫌悪条件づけ

3.4.1.1. 目的

モノアラガイにおいて、侵害刺激は唯一の防御手段である殻引き込み応答を引き起こす刺激であり、1. 化学刺激(KCl など)(Kojima et al., 1996)、2. 接触刺激(Lukowiak et al., 2014; Kawai et al., 2004)、3. 振動刺激(Sakakibara et al., 2006, 1998, 2005)、4. 陰影刺激(Chono et al., 2002; Pankey et al., 2010; Sunada et al., 2010; Stoll et al., 1972; Takigami et al., 2014a)の4種類の感覚刺激が知られている。モノアラガイ味覚嫌悪条件づけの無条件刺激(US)として、苦味物質とされる KCl やキニーネの投与(Sugai et al., 2007)や強力な物理的接触刺激が用いられている(Kawai et al., 2004)。これらの無条件刺激は殻引き込み行動介在ニューロンである PeD11 (Pedal Dorsal 11)に投射される(Sunada et al., 2010a, b, 2014; Inoue et al., 1996)。その興奮が運動ニューロンを発火させ殻引き込み行動を誘発される(Ferguson et al., 1991)。味覚嫌悪条件づけではこのような侵害性刺激を US、モノアラガイに咀嚼行動を誘発する味覚刺激を条件刺激(CS)として用い、条件刺激と無条件刺激を組とした組刺激を提示することで、条件刺激後に無条件刺激が提示されるという時間関係を学習させる。例えばCSをショ糖とした場合に、学習後にCSであるショ糖を投与しても積極的な摂食行動はしなくなるという形で行動変化が生じ、学習・記憶が評価される(Kawai et al., 2004)。

これまでの US 刺激方法の技術的な問題点として、苦味物質の投与では投与された物質の洗い流しが十分でなければならぬ点、接触刺激においては刺激強度を実験者の感覚に頼らなければならぬ点の2点が挙げられる。これらを改善することができれば実験者の熟練度を問題としない、より簡便で精度の高い方法が開発可能であると考えられる。本章ではこの改善策として、電気刺激を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけを提案する。予備実験の結果、水中に 1000V のパルス通電を与えることでモノアラガイは殻引き込み行動を引き起こすことから電気刺激は有効な侵害性刺激として認識されたと考えられた。電気刺激の無条件刺激としての利用は、モノアラガイが殻引き込み応答を引き起こすのに十分な刺激強度を持ち、刺激を与えるタイミングと刺激の持続時間をより正確に、更に多様に設定で

きる利点がある。

陸上性カタツムリ (*Halix pomatia*, *Halix luconm*) を使用した味覚嫌悪条件づけでは、既に電気刺激が無条件刺激として用いられている (Kiss et al., 2009; Maximova et al., 1984)。この種を用いた味覚嫌悪条件づけでは陸上 (床面) に設置した電極または接触型の電極から電気刺激を与えている。これらの方法の欠点として二本の電極に体足部等が接触していなければ刺激を与えることができない、または、電気刺激の前に接触刺激を与えてしまうという刺激法固有の問題がある。本研究に用いたモノアラガイの生活圏は水中であり、水を介して非接触の電極から刺激を与えることが可能であり、これらの問題は回避できる。

本章では味覚嫌悪条件づけに使用されてきたモノアラガイの頭部への接触刺激に替えて新に電気刺激が有効であるか以下の 3 点から詳しく検討した。1) 殻引き込み行動持続時間；電気刺激によって誘発される殻引き込み行動の持続時間を計測することで適切な電気刺激強度と組刺激間隔を決定した。2) 組刺激回数による記憶形成の変化；組刺激回数を変えて条件づけを行うことで LTM を形成するのに必要な組刺激回数を調査した。3) 記憶保持期間の測定；最少組刺激回数とその時に LTM を形成した場合の記憶保持期間を 4 週間まで調査した。以上 3 点を検討することで電気刺激を無条件刺激とする味覚嫌悪条件づけの特性を評価した。

3.4.1.2. 方法

3.4.1.2.1. 電気刺激装置

電気刺激装置はラケット型電撃殺虫器 (FIFTY Co., Ltd.) のラケット部を取り外し、そこに 2 本のシリンジ用注射針 (18G ; TERUMO CORPORATION,) を電極として取り付け、電極間距離は 2cm とした。本装置の刺激強度は出力電圧約 1000V、電流量 80 μ A として 0.2 秒間動物付近の水中へ放電させることで US を提示した。また、電極はゴムチューブで被覆し先端の

み露出させた。

3.4.1.2.2. 高電圧刺激によるモノアラガイの行動変化の計測

装置内の環境に慣れさせたモノアラガイに電気刺激を提示し、殻引き込み行動を誘発させ、この殻引き込み行動の持続時間を計測した。殻引き込み行動の持続時間はモノアラガイへ刺激を行ってから殻引き込みにより体全体を殻に収め、その後、殻の端から眼が外部から目視できるまでの時間、加えて、モノアラガイへの1回目の組刺激（10秒間のCSと、後の0.2秒間のUS）による咀嚼行動停止期間を計測した。

3.4.1.2.3. 味覚嫌悪条件づけ

味覚嫌悪条件づけ装置及び方法は第2章と同様とした。CS（100mM ショ糖：1ml/5s）とUS（電気刺激 1000V、80 μ A/0.2s）を組刺激として(Fig. 3-4-1-1B)、1分毎に組刺激を5、8、10、15、または20回を1日で与える条件づけを行った。また、記憶保持期間の決定はPost-Test 10min と Post-Test 24h に加えて、72時間後(Post-Test 72h)、1週間後(Post-Test 1w)、2週間後(Post-Test 2w)、3週間後(Post-Test 3w)、4週間後(Post-Test 4w)の時点でのCSに対とする咀嚼回数を計測した(Fig. 3-4-1-1A)。

条件づけはCS-USの手順で組刺激を繰り返して行う群(Forward)と、US-CSの手順とする逆手順群(Backward; US-CS/15回)の2群に大別して行った。Backward群は条件づけが刺激手順に依存することを示す対照とした(Fig. 3-4-1-1B)。

3.4.1.3. 結果

3.4.1.3.1. 高電圧刺激によるモノアラガイの行動変化

USに電気刺激を使用するに当たり最初に電気刺激によるモノアラガイの殻引き込み行動

持続時間を計測した。モノアラガイは電気刺激によって殻引き込み行動が誘発される(Fig. 3-4-1-2A, B)。殻引き込み持続時間として、モノアラガイへ刺激を行ってから殻引き込みにより体全体を殻に収め、その後、殻の端から目が出てくるまでの時間を測定した。その結果、殻引き込み持続時間は 24.3 ± 2.93 s (mean \pm S.E.; $n=20$)であった。また、モノアラガイは CS により咀嚼行動を誘発し、その後、US を与えることで咀嚼行動は停止することを観察した。Naïve モノアラガイへ組刺激を 1 回与えた場合の咀嚼行動停止時間は 24.6 ± 4.08 s (mean \pm S.E.; $n=20$)であった。

3.4.1.3.2. 無条件刺激を電気刺激とした味覚嫌悪条件づけ

電気刺激を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけにおいて、記憶形成に必要な組刺激回数を調査した。モノアラガイへ与える組刺激回数は 5、8、10、15、20 回とし、Pre-Test に対してと Post-Test 10min、24h の咀嚼回数を比較した。結果、Fig. 3-4-1-3A に示すように各組刺激回数の全てで STM の形成が見られ、LTM の形成は 15 回の組刺激でのみ観察された ($p < 0.001$)。一方、Backward 群において、咀嚼回数は 10min、24h の Post-Test においても Pre-Test と同等で(Fig. 3-4-1-3US-CS)、CS-US の組み合わせに学習獲得の要因があった。

Fig. 3-4-1-3B において組刺激数の異なる各群 Pre-Test を基準とした Post-Test 咀嚼回数の推移をプロットした。そこで観察されたのが Post-Test 24h における U 字曲線である。5、8、10 回の組刺激では組刺激回数の増加に伴って 24 時間後の咀嚼回数が減少傾向にあり、15 回の組刺激で LTM を形成する。しかし、20 回の組刺激では 15 回の組刺激と同様な LTM は観察されない。このような U 字型の曲線を示し、LTM の指標となる咀嚼回数は組刺激回数の増加に伴って減少する単調な性質ではないことが示された。一方 STM は、組刺激回数を増加させることでより強固に形成された。これらより、電気刺激を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけにおいて、組刺激の最適数は 15 回であると判断した。

3.4.1.3.3. 記憶の保持期間

電気刺激を無条件刺激として 15 回の組刺激を行い、Post-Test 24h 時に学習が成立したと判断された個体(n=12)を対照として記憶の保持期間を引き続き 4 週間後まで観察した(Fig. 3-4-1-4)。全ての個体で Post-Test 10min 時の咀嚼回数が 0 回であり STM は強固に形成されていた。そして、Post-Test 24h までに記憶が保持され、Post-Test 72h 時に一度記憶が忘却されるように観察されるが、Post-Test 1w にて再固定された。その後、Post-Test 2w にて完全に忘却されることから記憶の保持期間は 1 週間程度であると考えられる。また、Pre-Test と比較して 4 週間に渡り咀嚼回数が減少している個体も存在した。

3.4.1.4. 考察

ショ糖を条件刺激(CS)、新しく導入した高電圧刺激を US とした組刺激によって味覚嫌悪条件づけが成立することが示された。Forward 群においては、5、8、10、15、20 回の組刺激により STM が形成された。しかし LTM に関しては、15 回の組刺激時でのみ LTM が形成されたが、20 回の組刺激では LTM は形成されなかった。これまでの味覚嫌悪条件づけにおいて、CS としてショ糖、US として KCl を使用した場合、LTM の形成には 10 回の組刺激を必要とし(Kojima et al., 1996)、US として頭部への接触刺激を使用した場合は、LTM を形成させる為に 20 回の組刺激を必要とした(Kawai et al., 2004)。加えて、モノアラガイにおける光-振動条件づけで US として使用される機械による回転振動では 1 日 30 回の組刺激を 3 日間で行うことが必要とされた(Sakakibara et al., 1998)。従って、モノアラガイ条件づけにおいて嫌悪学習の LTM を形成させるには US の選択が非常に重要な要因であると結論づけられる。US として使用される嫌悪刺激において、全ての刺激に対してモノアラガイに殻引き込み行動が共通に誘発された。しかし、LTM 形成するために必要な組刺激回数が US の種類によって異なる。条件づけ後に LTM が形成されるかについてはモノアラガイ神経系の発達

段階に大きく左右されるとする報告がある(McComb et al., 2005; Ono et al., 2002; Orr et al., 2010; Yamanaka et al., 1999)。また、それぞれの US が処理される神経回路の経路が異なることが考えられるが、US として使用される侵害性刺激は PeD11 ニューロンで受容されており、異なる侵害刺激で引き起こされる PeD11 ニューロンの膜電位変化に異なる影響を及ぼすものと考えられた。詳細な考察は電気生理学的に US が受容される神経回路内の神経細胞を調べる必要があるため、今後の検討に残された。

記憶の保持期間は記憶の強さに対する一つの指標である。モノアラガイにおける記憶の評価基準の一つは記憶の保持期間を測定することである(Kennedy et al., 2010; Fruson et al., 2012)。記憶の保持期間を測定することにより、より詳細な記憶の形成強度を測ることができる。しかし、味覚嫌悪条件づけの長期間の測定では、本研究で示したように条件づけの前日から絶食させることにより LTM 形成後のモノアラガイには食物に対する強い欲求衝動があるため、記憶を想起させる CS の提示によっても組刺激後 72 時間において観察された咀嚼回数の上昇のように(Fig. 3-4-1-4)恒常的な咀嚼応答を示す傾向がある。その為、記憶の保持期間を長期に正確に測定することは難しい。この問題に対して、CS としてショ糖により条件づけを行い、ショ糖とは全く異なる食物（キャベツなど）をエサとして常時与え、CS とするショ糖とエサとする食物を別々に記憶させたことで 4 週間に渡り咀嚼回数が減少し続けた個体も存在したことから(Sugai et al., 2006)、このような方法をとれば記憶への干渉を回避できる可能性がある。

また、記憶形成の初期段階（組刺激後 30 分と 2 時間）において、記憶が忘却されたように観察される時間があることが知られている(Marra et al., 2013)。彼らの研究では STM から ITM、ITM から LTM への記憶形成段階に伴う変化であると示唆している。本実験においても記憶保持期間(Fig. 3-4-1-4)の組刺激後 72 時間において記憶が忘却されたように観察された。これは、STM、ITM、LTM と分類する記憶形成段階とは異なる期間で引き起こされた記憶形成の段階的变化に伴うものであるとも考えられた。しかし、モノアラガイ味覚嫌悪

条件づけを使用して記憶保持期間を調査した研究は存在するが(Sugai et al., 2006)、条件づけ後 72 時間で引き起こされた忘却について言及されているものは無い為、無条件刺激を電気刺激とした味覚嫌悪条件づけに特異的に表れるものであるとも考えられた。しかしながら、これらについての詳細な考察は条件づけ 72 時間後で電気生理学的検討が必要となるだろう。

5、8、10、20 回の組刺激では LTM は形成されず、STM の形成に留まった。5、8、10 回の組刺激では動物は大きなストレスは感じないが、20 回の組刺激では過剰なストレスとなると仮定した場合に、ヤーキス・ドッドソンの法則にある U 字曲線が適用されると考えられる(Calabrese et al., 2008; Yerkes, Dodson et al., 1908; Ito et al., 2015)。即ち、学習には最適なストレスレベルが存在し、最適レベルを上回るストレスを動物が感じる学習を行った場合に、学習の効率が低下するというものである。モノアラガイのオペラント条件づけにおいては、過剰なストレスを与える実験方法 (KCl などの長時間投与) により記憶形成が抑制されることが示されている(Dalesman et al., 2011; Lukowiak et al., 2010; Martens et al., 2007)。従って、1000V、80 μ A の電気刺激を用いた条件づけでは 20 回の組刺激がモノアラガイに過剰なストレスを与えた可能性が高い。

陸棲カタツムリ (*Halix pomatia*, *Halix luconm*) の味覚嫌悪条件づけにおいては既に電気刺激が無条件刺激として用いられている(Kiss et al., 2009; Maximova et al., 1984)。これらの種を用いた味覚嫌悪条件づけでは陸上に設置した電極または、接触型の電極から電気刺激を与える。これらの欠点として二本の電極に体表部が接触しなければ刺激を与えることができないことが挙げられる。また、電極の接触が電気刺激前に機械的刺激を与えることも考慮しなくてはならない。本研究に用いたモノアラガイの生活圏は水中であり、非接触型電極により刺激を与えることが可能である。また、味覚嫌悪条件づけにおいて学習を成立させる為には一定以上の刺激強度が必要である。電気刺激を US とした場合には刺激強度は調節可能で、完全な殻引き込みが誘発されない程度の強度で与えることも可能と考えられ、これは味覚嗜好条件づけにも利用できる可能性が高い。味覚嗜好条件づけでは条件刺激として、

動物の行動に影響を及ぼさない中性刺激が使用される(Marra et al., 2013)。電気刺激を動物の行動に影響を及ぼさないレベルの低強度刺激とすることで味覚嗜好条件づけの条件刺激として使用できる可能性が高い。これらはいずれも電気刺激を使用した条件づけをモノアラガイで行う上での利点として挙げられる。

モノアラガイは警戒度が高い場合には、特に刺激を受けなくても触覚まで頭を殻に引き込み、微細な刺激（影や振動）でも体全体を殻に収める(Sunada et al., 2012)。こうなると頭部への接触刺激を与えることは不可能となり、接触による US の提示ができない。非接触型電極を通しての電気刺激であればモノアラガイの状態に関わらず US の提示が可能であるために、動物がそれまでの恐怖体験に依存して警戒度が高い場合においてもあらかじめ定められた強度の刺激を与えることが可能で、組刺激を実験計画通りに提示することができる。また、接触刺激を使用した味覚嫌悪条件づけでは常にモノアラガイが装置内を常に動くために刺激を与える部位を一定に保つためには、刺激棒の位置を常に変化させなくてはならない。この変化に対応して、実験者が US を制御する必要があり、それには実験者の経験が要求された。しかし、非接触型電極を使用した電気刺激による US が可能となったことで、動物の動きへ対応する必要性がほぼ無くなることも実験実施の上では大きな利点となる。

最後にまとめると、電気刺激を US としても、これまで報告のあるモノアラガイ味覚嫌悪条件づけ(Kawai et al., 2004)と同様の条件づけが可能で、常に殻引き込みを誘発する一定以上の刺激強度で条件づけが可能となった。加えて、US を人間の手を介することなく、刺激時間も任意に設定することが可能となった。位置固定した電極による電氣的侵害刺激の導入によりモノアラガイの味覚嫌悪条件づけの作業を、自動化することを視野に入れることができるようになった。

図と図の説明

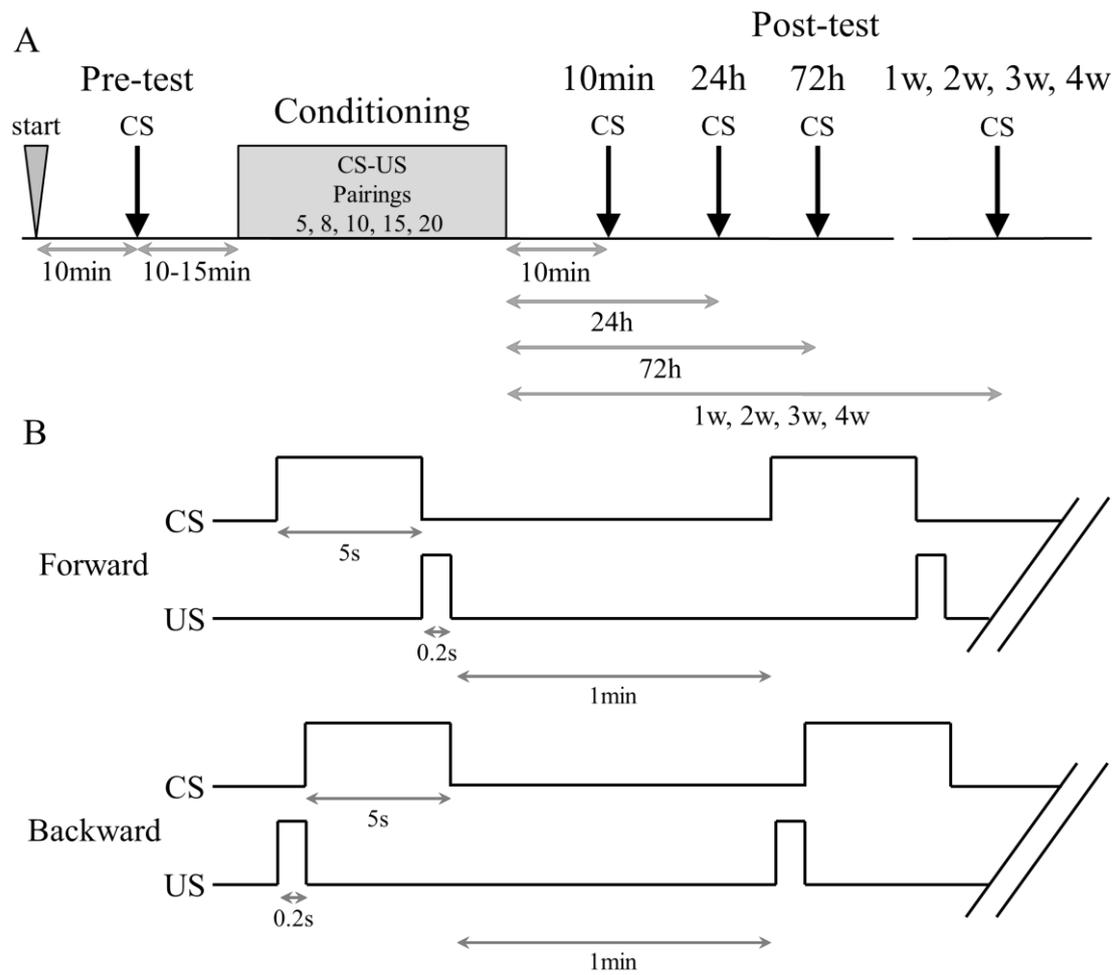


Fig. 3-4-1-1 実験方法

実験パラダイム (A)、実験開始からモノアラガイを 10 分間静置し、Pre Test として 1 分間のショ糖に対する咀嚼回数を記録した。その後、10 分間静置した後に条件づけを行った。条件づけ後、Post-Test として 10min、24h、72h、1w に Pre-Test 同様にして咀嚼回数を記録した。刺激の時間関係(B)、Forward 群では 1 分間隔で 5 秒間のショ糖提示後に 1000V、80 μ A、0.2 秒の電気刺激印加を行った。Backward 群においては 1 分間隔で 0.2 秒の電気刺激印加後、5 秒間のショ糖を提示する組刺激を 15 回行った。

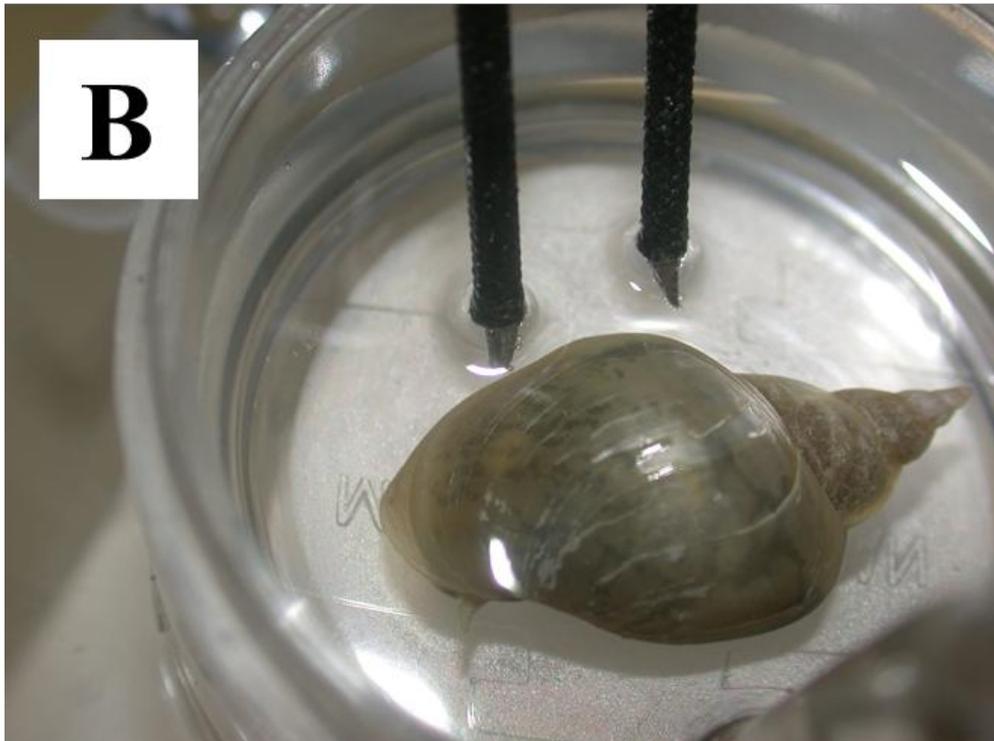
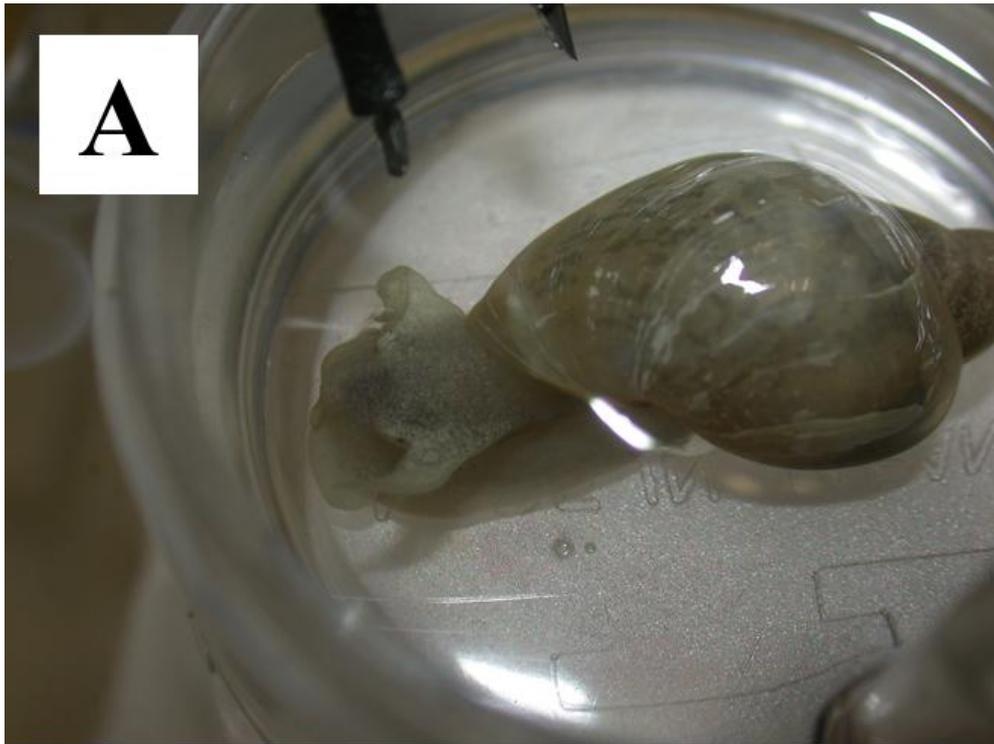


Fig. 3-4-1-2 電気刺激印加によるモノアラガイの殻引き込み応答
モノアラガイは水中への電気刺激印加により殻引き込み応答を示す。図において2本の黒い棒状のものが電極であり、電極は常に体表付近において刺激を印加した。刺激強度は出力電圧約1000V、出力電流量 $80\mu\text{A}$ とした。刺激前(A)。刺激後(B)。

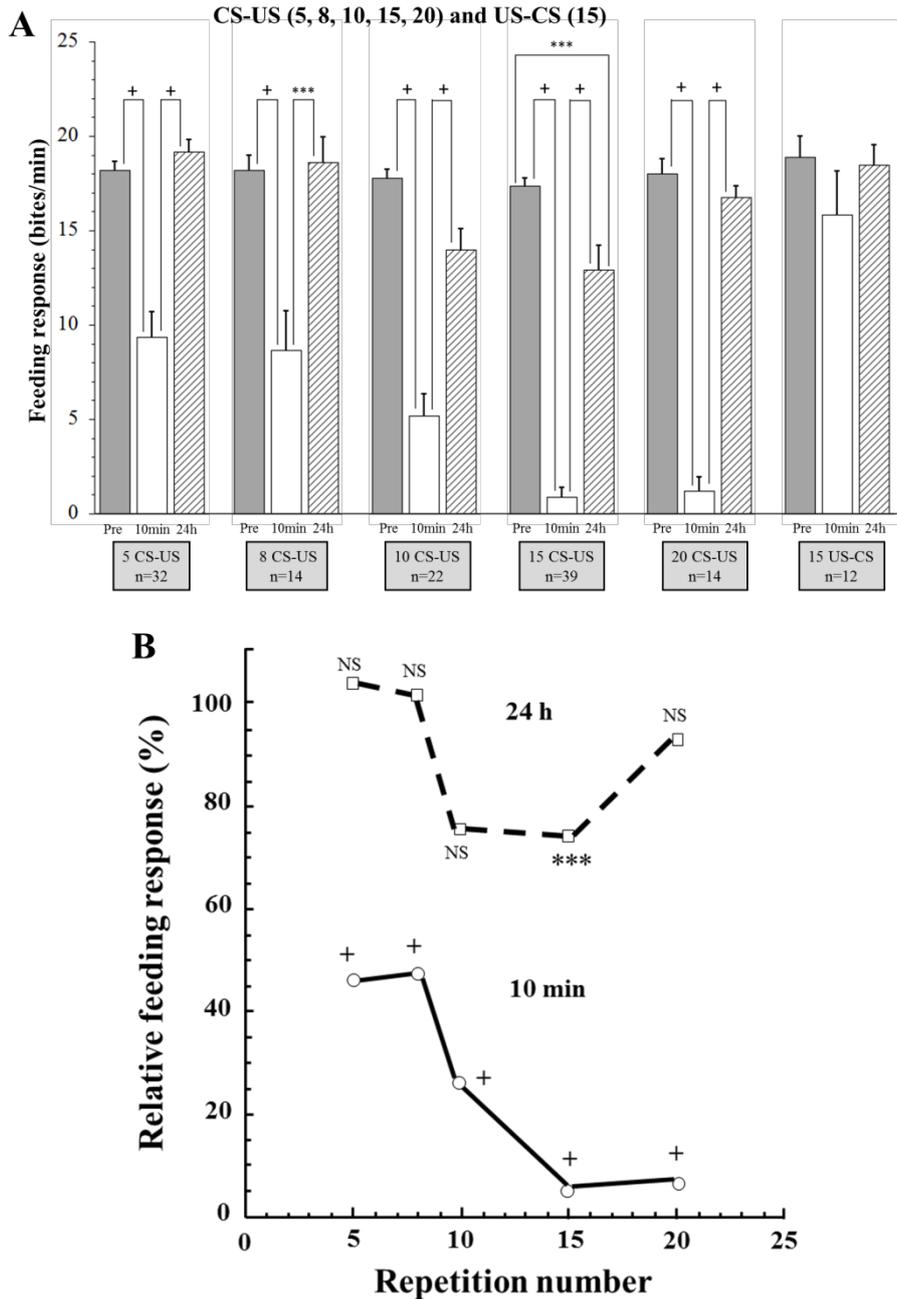


Fig. 3-4-1-3 電気刺激を US とした異なる組刺激回数における条件づけ条件づけにおいて組刺激回数を 5、8、10、15、20 回として Pre-Test、Post-Test 10min、Post-Test 24h のショ糖に対する咀嚼回数を比較した(A)。全ての条件において STM 形成が見られたが、LTM の形成は 15 回の組刺激でのみ観察された。15 US-CS は Backward 群(n=12)を示す。US-CS を組刺激とした Backward 群においては、STM、LTM の双方の形成が観察されなかった。組刺激回数と記憶形成(咀嚼回数)の関係(B)。B において、縦軸は咀嚼回数の Pre-Test を基準とした相対率(%)とし、横軸は組刺激回数を示した。STM と LTM の双方の成立が見られたのは 15 回の組刺激でのみであった。(NS: not significant, *** $p < 0.001$; + $p < 0.0001$)

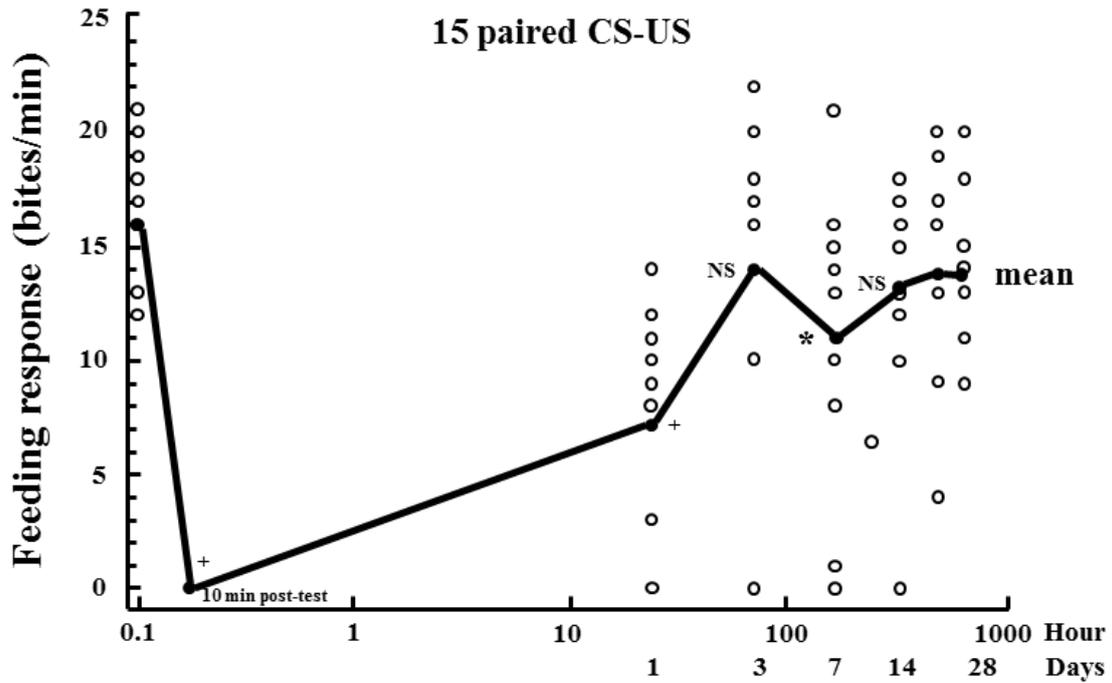


Fig. 3-4-1-4 味覚嫌悪条件づけにおけるモノアラガイ咀嚼回数の経時変化
 グラフにおいて、黒丸は時間内における平均を示し、白丸は各個体値を示す。折れ線については平均値を繋げたものである。15回の組刺激によってPost-Test 24hにおいて学習を獲得した個体(n=12)の記憶保持期間を4週間まで(Post-Test 10min, 24h, 72h 1w, 2w, 3w, 4w)の咀嚼回数によって記録した。Post-Test 10min, 24h, 1wにおいてPre-Testと比べて咀嚼回数が有意に減少ことから記憶は1w保持されたと判断される。(NS: not significant, * $p < 0.005$, + $p < 0.0001$)

第3章

3.4. 集中学習と分散学習の生理学的意味

3.4.2. 集中学習と分散学習

3.4.2.1. 目的

本項において、咀嚼行動の停止と共に殻引き込み応答を引き起こす無条件刺激(US)として一般的な接触刺激や化学刺激(KCl など)に替えて高電圧刺激を使用した。本実験では条件づけ後 3 時間の時点において第 3 章 3.3 で示した冷却を用いた記憶の忘却方法ではなく、分散学習のタイミングによる記憶の強化を行うことで、条件づけ後 3 時間という時点が忘却だけでなく記憶強化にとっても感受性期として重要な時点となっているか調べることを目的にした。具体的には以下 3 点について調査した。最初に第 3 章 3.3 で示した 1 日 5 回の組刺激を 4 日間で行う条件づけを行った。電気刺激を無条件刺激とする味覚嫌悪条件づけにおいて、より少ない合計 8 回の組刺激回数とした場合に 3 時間の時間間隔を空けた分散学習とする実験条件により学習の効率性を上げることに繋がるか調べた。加えて、分散学習による記憶形成の強化により第 3 章 3.4.1 において STM は形成するが LTM が形成されなかった 20 回の組刺激でも分散学習によって LTM を形成させることができるか調べた。第 2 に第 3 章 3.3.1 で LTM が唯一形成された 15 回の組刺激において、分散学習の適用によって形成される LTM がより強固となるかについても調べた。第 3 に条件づけが成立しない 8 回の組刺激であっても分散学習によって条件づけが成立し LTM が形成されるか、また、形成される LTM とブライオスタチンによって強化された記憶の比較を行った。この時、組刺激を 2 セットに分散させる場合の間隔を 1 時間と 3 時間として特に注意して実験を行った。これら結果より、これまでの研究で明らかとなっているモノアラガイ記憶形成の過程に関する新たな知見として、条件づけ 3 時間後が記憶形成に重要な時点であることを示唆した (Takahashi et al., 2013; Takigami et al., 2014c)。

3.4.2.2. 方法

3.4.2.2.1. 集中学習と分散学習

ショ糖による CS (5s)と電気刺激による US (1000V- 0.2s)を組刺激として、1 分間隔でモノアラガイに複数回与える条件づけを集中学習(Massed training)とした(Fig. 3-4-2-1A)。分散学習(Spaced training)は、合計 8 回、15 回、20 回とした組刺激を 2 つのセットに分けて条件づけを行った。分散した第 1 セットと第 2 セットの間隔は 1 時間及び、3 時間とした。合計 8 回の組刺激とした分散学習では、第 1 セットとして 5 回の組刺激を行い、第 2 セットとして 3 回の組刺激を行った。合計 15 回の組刺激とした分散学習では第 1 セットを 10 回の組刺激、第 2 セットを 5 回の組刺激とした。合計 20 回の組刺激においては、第 1 セットを 10 回の組刺激、第 2 セットを 10 回の組刺激、空ける時間間隔は 1、3 時間に加えて 1 日間を追加すると共に、1 日に合計 5 回の組刺激を 4 日間与える分散学習も行った(Fig. 3-4-2-1B)。

3.4.2.2.2. ブライオスタチンの処理

C キナーゼ活性化剤のブライオスタチンの処理方法についてはこれまでの章(3.2、3.3)で記述したものと同様とした。本研究におけるブライオスタチン濃度(0.1ng/ml)はウミウシ(Alkon et al.,2005; Kuzirian et al.,2006)とモノアラガイ(Rosenegger et al., 2008)に効果的であると知られているブライオスタチンの最高濃度の 5 分の 1 であることは特記する必要がある。モノアラガイはストック溶液を 10 ml (0.1ng/ml)となるように飼育水で希釈した溶液内に 40 分間入れることで C キナーゼを活性化させ、その後置水と入れ替えた。これらの処理を「ブライオスタチン処理」とした。ブライオスタチン処理は合計 8 回の分散学習の第 1 セット直後に行った。

3.4.2.3. 結果

3.4.2.3.1. 合計 20 回の組刺激を 4 日間で行う分散学習

第 3 章 3.3 で US として接触刺激を使用した味覚嫌悪条件づけにおいて、LTM を形成させるのに必要な実験条件として合計 20 回の組刺激を 1 日 5 回として 4 日間に分散させて行う必要があった。US を電気刺激とした場合であっても同様の分散学習によって LTM を形成させることができるか調べた。この実験条件におけるモノアラガイの日ごとの咀嚼回数の変化を Fig. 3-4-2-2A 示した。1 日目の 10 分後 Post-Test で観察されるように 5 回の組刺激によりモノアラガイの咀嚼行動は Pre-Test と比較して大きく抑制された($p < 0.0001$)。従って、本実験条件において、モノアラガイは STM を形成したと判断された。しかし、CS により誘発される咀嚼行動の抑制は条件づけ期間中に日を跨って持続しないことが観察され、20 回の組刺激後の 24 時間テスト(Post-Test 96h)においても Pre-Test との間で統計学的には有意な差は検出できなかった。

1 日間で合計 20 回の組刺激を与える集中学習及び、合計 20 回の組刺激を各日 10 回として 2 日間で行う分散学習とした実験条件においても STM は形成されるが LTM は形成されない(Fig. 3-4-2-2B—Massed, Spaced 1D)。しかし、分散学習において、第 1 セットと第 2 セットの間には 1 時間及び、3 時間空けた実験条件においては STM、LTM の形成が観察された(Fig. 3-4-2B—Spaced 1h, Spaced 3h)。

3.4.2.3.2. 集中学習と分散学習による記憶形成

集中学習手順において、15 回の組刺激が STM、LTM を形成させるのに最適であることを第 3 章 3.4.1 で示した。各日に少数回の組刺激を行う分散学習によって、より強固な LTM を形成するか調べた(Fig. 3-4-3)。Post-Test 24h の CS に対する咀嚼行動は集中学習手順(Fig. 3-4-3—Massed)による咀嚼回数より、分散学習手順(Fig. 3-4-2-3 - Spaced 1h, 3h)による場合に

大きな抑制を示した。このような実験事実は合計 15 回の組刺激として組刺激回数は同じであるが、セットの間に動物への休息時間を置くことで集中学習群(Massed)では 24 時間後テストの結果が 12.9 ± 1.2 回、セット間隔に 1 時間空けた分散学習では 12.3 ± 1.3 回となったが、セット間隔を 3 時間空けた分散学習では 7.6 ± 1.2 回となり LTM をより強固に形成させることが示された。しかし、本実験条件の集中学習手順及び分散学習手順で、STM 形成の程度は同じであった。

分散学習手順により強固な LTM を形成することを示したが、更に少ない組刺激回数によっても LTM を形成させることが可能であるか調べた。分散学習手順における第 1 セットの組刺激回数を 5 回、第 2 セットを 3 回として、合計 8 回の組刺激をモノアラガイに与えた結果を Fig. 3-4-2-4 に示した。集中学習手順(Fig. 3-4-4—Control Ms)及び、セット間隔 1 時間とした分散学習(Fig. 3-4-2-4—Control Sp-1h)においては STM の形成が観察されるが、LTM は観察できなかったが、セット間隔を 3 時間とした分散学習(Fig. 3-4-2-4—Control Sp-3h)においては LTM が観察された。

3.4.2.3.3. C キナーゼ活性化による記憶形成の強化

分散学習手順へのブライオスタチン処理の適用は LTM を大幅に強化した(Fig. 3-4-2-4—Bryo Pre, Bryo Mid)。図ではセット間隔 1 時間の分散学習手順において、モノアラガイを第 1 セット前にブライオスタチン処理した群を Bryo Pre、第 1 セット後にブライオスタチン処理した群を Bryo Mid として示した。Bryo Pre 群より Bryo Mid 群でより強固に LTM は形成された (Bryo pre: $p < 0.01$; Bryo Mid: $p < 0.001$)。一方、条件づけ前にブライオスタチン処理した Backward 群 (Back Bryo)においては STM 及び、LTM は形成されなかった。また、セット間隔 3 時間とした分散学習(Fig. 3-4-2-4—Control Sp-3h)においては LTM が形成された。加えて、分散学習(Fig. 3-4-2-4—Control Sp-1h)を手順の基準としてブライオスタチン処理した 2 群(Fig. 3-4-2-4—Bryo Pre, Bryo Mid)においても LTM の形成が観察された。

3.4.2.4. 考察

分散学習手順は集中学習における LTM の形成より、さらに強固な LTM を形成させることが明らかとなった。また、合計 8 回の分散学習手順における結果は、セット間隔 3 時間の分散学習とブライオスタチン処理により同程度の LTM が形成され、加えて、ブライオスタチン処理を条件づけ前に行うか、条件づけの間に行うかについてのタイミングは LTM 形成程度に影響しないことが実験結果から推察された。

味覚嫌悪条件づけを行ったモノアラガイの STM から LTM への記憶形成は集中学習と比べて、セット間に時間間隔を 3 時間空けた分散学習により、一層強固な LTM が形成された。条件づけ後 3 時間は記憶形成にとって重要な感受性期であることを本論文の第 3 章 3.3 で示唆した。セット間隔に 3 時間空けた分散学習がより強固な LTM を形成したことは ITM や LTM のような記憶の形成過程に再度組刺激を行うことでより強固に記憶が形成されることを示すと考えられる。このように、条件づけ途中でセット間隔を空けることは記憶を形成する上で、集中学習手順より効果的であることが示された。また、US を高電圧刺激とした場合であってもブライオスタチン処理が LTM 形成の過程を強化することが観察された。さらに、STM を形成する 5 回の組刺激回数で STM を形成させた後、十分に C キナーゼが活性化することで STM から LTM への移行が進み、そのうえより強固な LTM が形成されることを観察した。以上より、US を電気刺激としても、ブライオスタチン処理の効果は、第 3 章 3.1 で示した接触刺激を用いた結果と一致した。ブライオスタチン処理による記憶を強化する効果は、無脊椎動物の代表的なシステムであるウミウシ(Alkon et al., 2005; Kuzirian et al., 2006)やモノアラガイ(Rosenegger et al., 2008)でのみに観察されるだけでなく、ラットの水迷路試験においても観察されている(Sun et al., 2008)。ブライオスタチンの活性化は神経細胞の樹状突起において棘状突起の数を増加させることでラットの海馬錐体細胞の形態変化を誘導することが示唆されており(Hongpaisan et al., 2007)、また、C キナーゼの活性化は学習による記憶形成の上で不可欠な要因であり、人間におけるアルツハイマー性の痴呆にも有

用に作用することが報告されている(Sun et al., 2005)。哺乳類の脳において C キナーゼアイソフォーム (C キナーゼ) の活性化がアミロイド β タンパク質の産生と蓄積を制御し、低下した信号伝達経路を修復する役割を持つことは、記憶容量の強化、シナプス形成の修復、シナプスの再構築によってアルツハイマー病の薬理的な治療効果が期待できるとされている(Etcheberrigaray et al., 2004; Sun et al., 2009)。

第 3 章 3.2 において、冷却阻害の実験より組刺激後 3 時間に LTM の形成を変更できる重要な期間があることを示した。この期間とよく似た記憶形成の時点がウミウシにも存在することが見出されている(Epstein et al., 2003)。本項の研究では集中学習手順(Fig. 3-4-4—Control Ms)において LTM が観察されなかった。しかし、セット間を 3 時間とした分散学習手順適用することで STM 及び LTM の形成は強化された(Fig. 3-4-4—Control Sp-3h)。これらの結果はウミウシの古典的条件づけを研究した Epstein et al. (2003)の結果と一致する。つまり、複数回の組刺激を第 1 セットと第 2 セットに分散して提示し、セット間隔 3 時間の休止期間は、通常用いられる学習を 1 日毎に分散させて行う分散学習と類似の記憶形成が生じたということである。従って、条件づけ後 3 時間が記憶の忘却にも強化にも重要な時期であると考えられた。

本実験においても分散学習及び、ブライオスタチン処理で同レベルの LTM が形成されることを見出した。これら結果は組刺激提示を中断した 3 時間の中に LTM 形成に必要となる遺伝子活性が C キナーゼによるリン酸化を通して行われ新規の mRNA 産生が行われたと解釈できる。従って、本項実験にて得た結果は、長期にわたる LTM の形成には、記憶の固定化プロセスが C キナーゼによって起動されるタンパク質合成の関与を可能にするために第 1 セット組刺激提示後の 3 時間の休息期間の後に第 2 セットの組刺激が必要であると考えられることで解釈可能であろう。

STM から LTM へと移行する記憶の形成過程における分子メカニズムの全容は現在でも不明な点が多い。本研究結果は記憶の固定化の際に生じる分子活性の一つを解決する手がか

りと成り得ると考える。加えて、これら手がかりを元に条件づけ 3 時間後で変化する分子プロセスを分子生物学的手法である Differential Display 法などによって記憶形成が変化する過程（条件づけ 180 分後）で働くタンパク質を同定していく必要がある。

図と図の説明

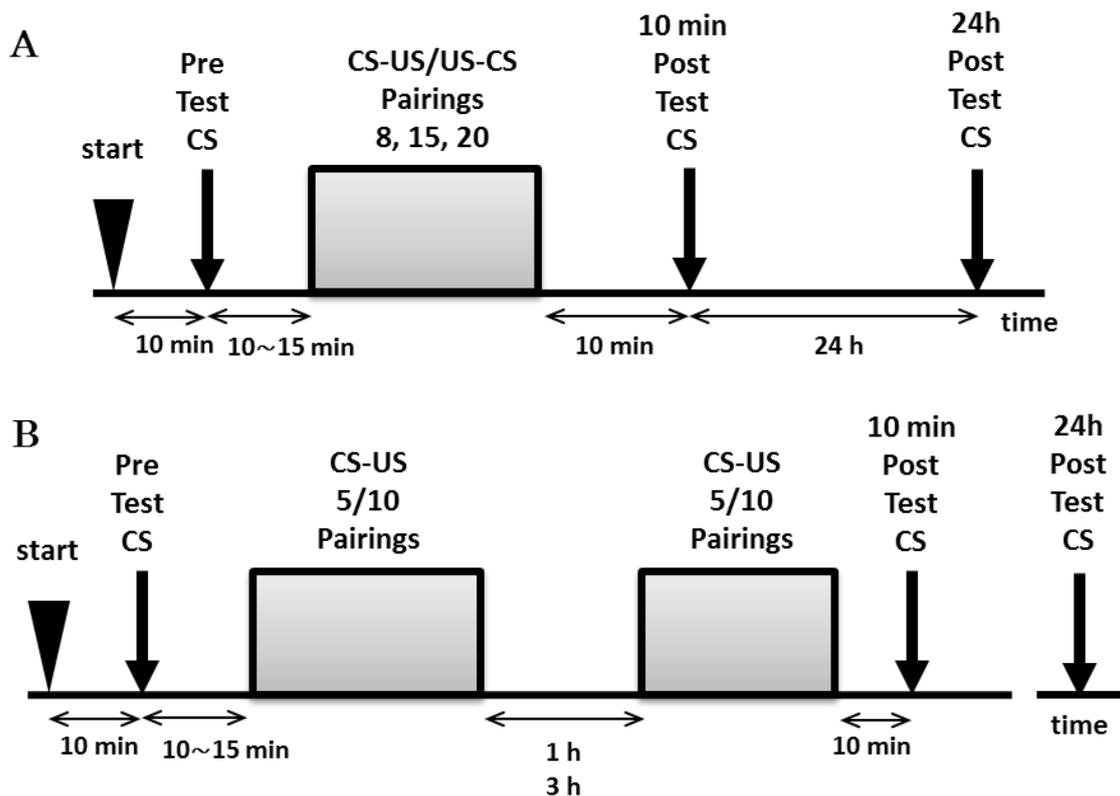


Fig. 3-4-2-1 実験パラダイム

集中学習の実験パラダイム(A)。実験開始からモノアラガイを10-15分間静置し、Pre-TestとしてCSを提示し、1分間のCSに対する咀嚼回数を記録した。その後、10-15分間静置した後に条件づけを行った。条件づけはCS(100mM ショ糖(1ml/5s))、US(電気刺激, 1000V, 0.2s)を1組とした組刺激を1分間毎に複数回(5、8、10、15、20回)与えた。条件づけ後、Post-Testとして10min、24hにPre-Test同様の方法で咀嚼回数を記録した。合計20回の組刺激を日を跨いで分散させた場合には1日の組刺激(5、10回)後に24時間空けて再度組刺激を与え、合計で20回組刺激を与えた後にPost-Testとして10分後、24時間後に咀嚼回数を記録した。分散学習の実験パラダイム(B)、実験方法は(A)と同一であるが異なる点は5/10回の組刺激後1時間または、3時間空けた後、3/5/10回の組刺激を与え、組刺激の合計が8回、15回または20回となるようにしたことである。

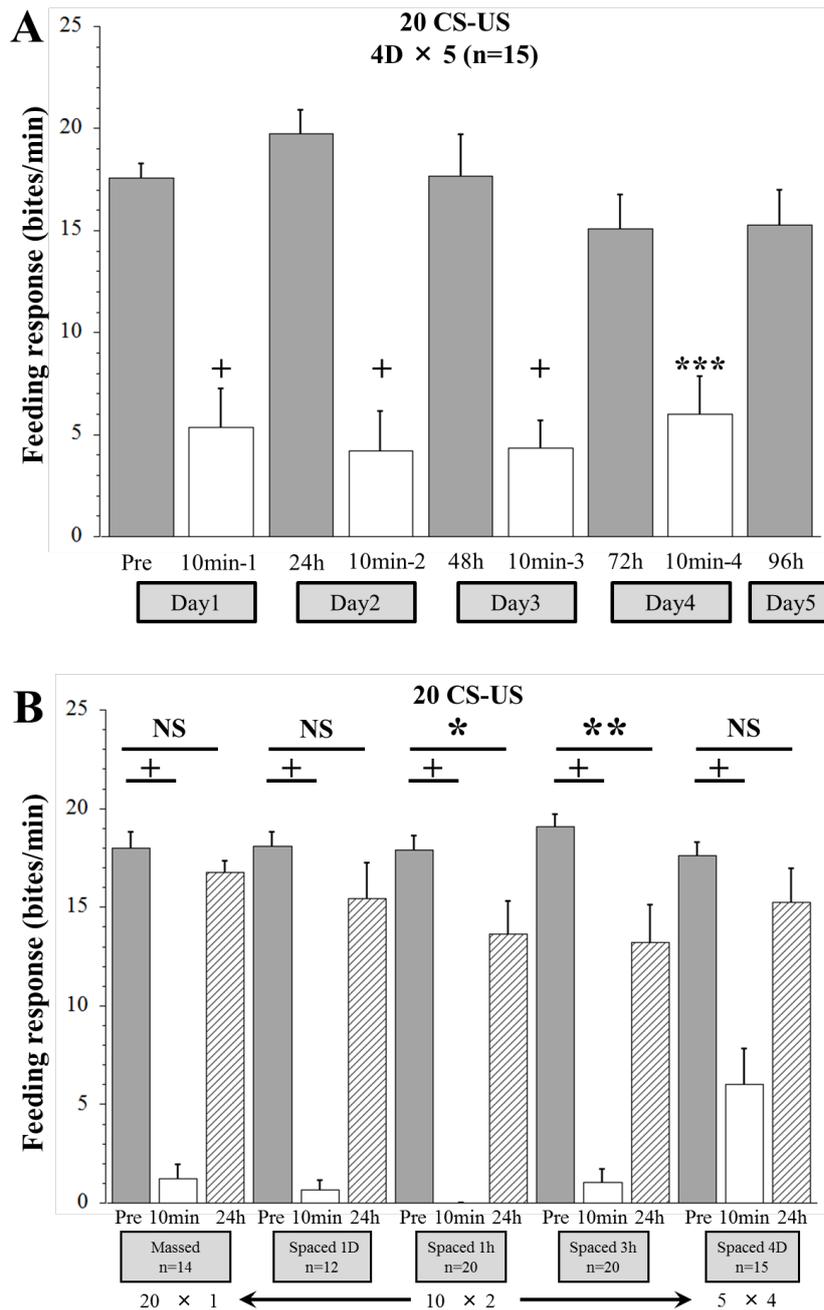


Fig. 3-4-2-2 20回の組刺激による分散学習と集中学習

合計20回の組刺激による条件づけのモノアラガイ咀嚼回数の変化。1日5回の組刺激を4日間に分散させて行った結果(A)。各日毎にSTMが形成されたが実験開始から5日後に測定されたPost-Test 24hにおいてLTMの形成は観察されなかった。合計20回の組刺激を10回毎に異なる時間で分散させて条件づけを行った結果(B)。Bにおいて空けた時間はMassed-集中学習手順つまり空き時間0、Spaced 1D-1日、Spaced 1h-1時間、Spaced 3h-3時間とした。右側に示したSpaced 4DはAでのDay1-Pre-Test、Day4-Post-Test及びDay5-Post-Test 24hを抜き出したものである。(NS: not significant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; + $p < 0.0001$)

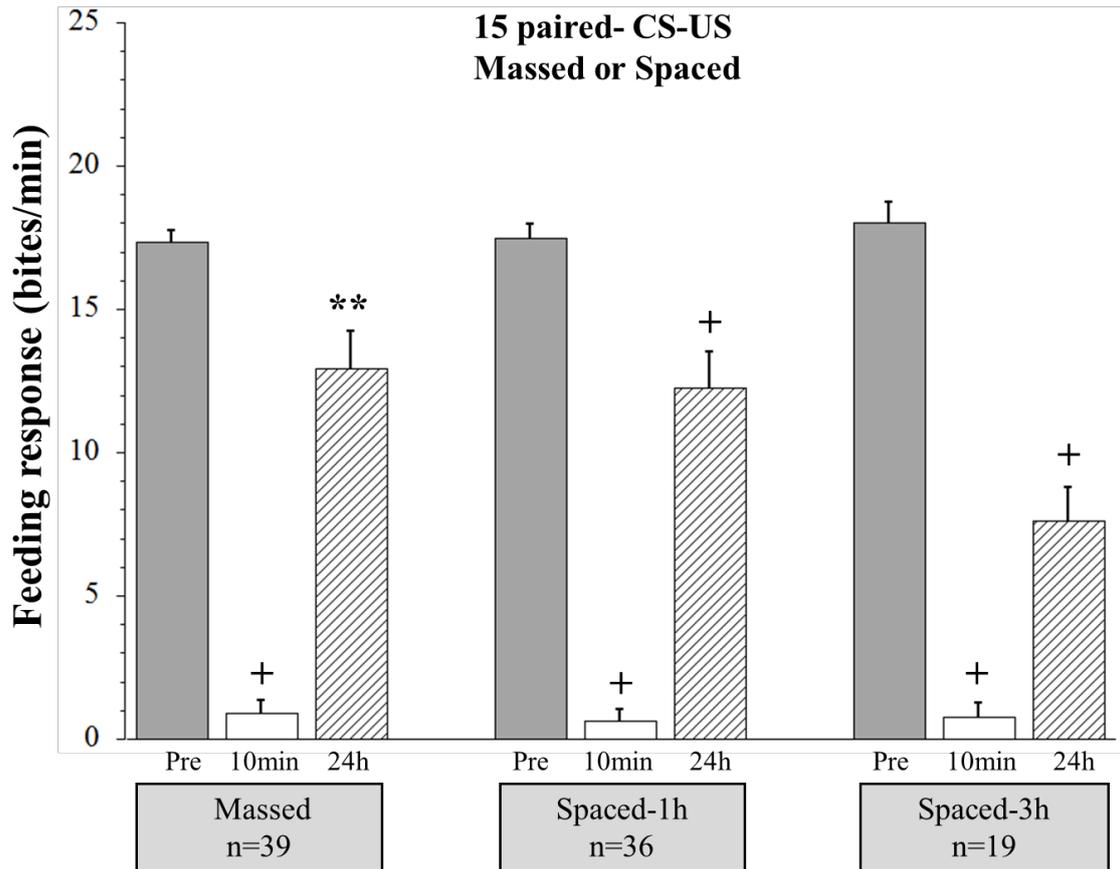


Fig. 3-4-2-3 分散学習による記憶形成の強化

合計15回の組刺激を分散学習とした記憶形成の比較。分散学習は10回の組刺激後、時間を空け、その後5回の組刺激を行った。1時間空けた群を Spaced-1h、3時間空けた群を Spaced-3h、として集中学習を行った群を Massed として示した。集中学習とした群においても STM、LTM の形成が観察されるが、咀嚼回数の抑制の程度は分散学習を行った2群の方が大きい。また、分散学習においても、Spaced-1h 群より Spaced-3h 群が大きく抑制された。 (** $p < 0.01$; + $p < 0.0001$)

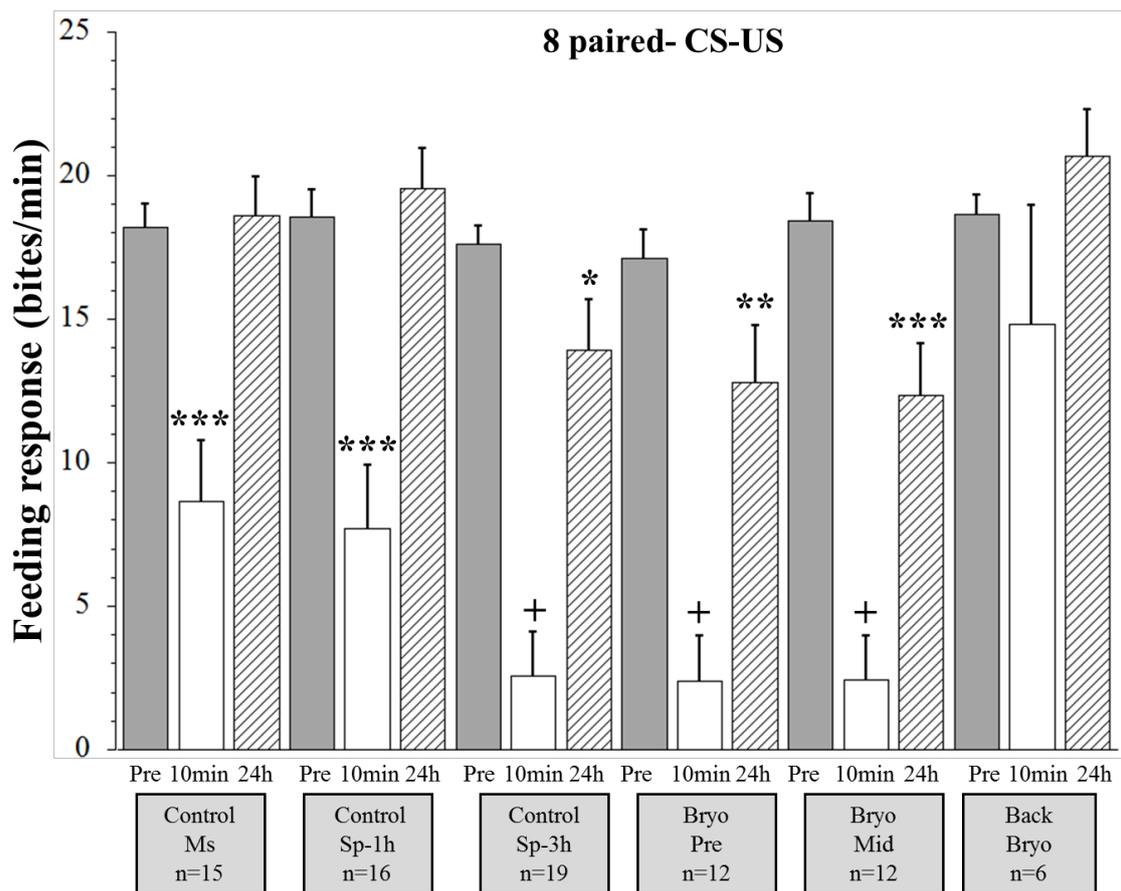


Fig. 3-4-2-4 分散学習とブライオスタチンによる記憶形成の強化

合計 8 回の組刺激を分散学習とした群とブライオスタチン処理を行った群の比較。分散学習は 5 回の組刺激後、時間を空け、その後 3 回の組刺激を行った。1 時間空けた群を Sp-1h、3 時間空けた群を Sp-3h、として集中学習を行った群を Ms として示した。ブライオスタチン処理後、組刺激の逆手順(US-CS とした手順 : Backward)を行った群(Back Bryo)においては STM、LTM のいずれも形成されなかった。Sp-1h 群と同様の方法にて条件づけを行い、条件づけ前にブライオスタチン処理を行った群を Bryo Pre、分散学習中の空けた時間にブライオスタチン処理を行った群を Bryo Mid として示した。(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; + $p < 0.0001$)

3.5. 第3章まとめ

記憶形成のプロセスについて以下のことが検討された。

第 1 に C キナーゼの活性化のタイミングによる記憶形成を評価した。C キナーゼをブライオスタチンにより活性化させるタイミングは条件づけ前から組刺激中、組刺激後までの時間経過に依存しないことが結果から導きだされた。加えて、ブライオスタチンによる C キナーゼ活性化後に C キナーゼ不活性化剤である Ro-32 によって処理することで LTM が形成されなくなった。しかし、Ro-32 処理後、ブライオスタチンによって C キナーゼを活性化させることで記憶形成は LTM が形成された。従って、記憶形成初期の C キナーゼの活性化が STM から LTM 形成へ移行する重要な要素であると考えられた。

第 2 に冷却阻害を実施するタイミングによる記憶形成への効果を評価した。冷却による記憶忘却は条件づけ直後 (0、4、7 分) と 180 分後に冷却することで記憶形成が阻害され、STM、LTM の双方が形成されなかった。しかし、条件づけ後 10、15 分では冷却による記憶形成への影響を確認することができなかった。これら結果は条件づけ後の、STM、ITM、LTM の記憶形成プロセスがモノアラガイ体内の生化学的変化の経過時間に反映され、条件づけ後 0~7 分で STM が形成し、条件づけ 180 分後に ITM が形成すると考えられた。また、STM 形成後または、ITM 形成後の僅かな時間に冷却による記憶忘却が観察されないことから、STM の形成後の ITM 形成までの時間で冷却による記憶形成プロセスの停止又は遅延は記憶形成にとって意味を成さないのかもしれない。

第 3 に STM と LTM を獲得するに要する最少の組刺激提示回数を機械的接触刺激(US1)と電気刺激(US2)を比較して US2 の有効性を示した。1 日のトレーニングの場合の必要とされる組刺激回数は CS-US1 場合には 20 回の組刺激回数を要するのに対して、CS-US2 の場合では 15 回の組刺激回数で十分であった。さらに、CS-US2 の場合には組刺激提示途中で 3 時間中断する分散学習によって、8 回の組刺激で LTM の形成を観察した。これら知見をまとめると、LTM を形成するために必要な感受性期は、遺伝子発現の変化に対応させることができると考えられるが、その時間が今回の実験結果から約 3 時間後であることが示唆され

た。この LTM 形成に必要な条件づけ後 3 時間の時点は、記憶の冷却阻害によって推定された時点と一致した。本研究による記憶の冷却阻害の結果では条件づけ直後及び、条件づけ後 3 時間が LTM 形成に重要な時点であることを見出した。記憶形成の作業仮説に対応するこれら時点において、LTM の形成過程に必要な事象は STM から ITM の形成では C キナーゼの活性化が必要とされ、また、僅かな C キナーゼの活性化であっても ITM の形成過程において再度 C キナーゼの活性化即ち、分散した組刺激を ITM の形成過程に行うことで記憶形成を促進する。

第4章

味覚嫌悪条件づけ自動化装置開発の試み
-自動学習装置の試作とその実用度の検証-

4.1. 諸言

第3章ではUSとして電気刺激を導入することによって味覚嫌悪条件づけ手順の自動化が可能であることを指摘した。本章では味覚嫌悪条件づけの自動化装置を実際に試作し、その性能を評価した。

本装置は研究及び、教育用支援機器としての使用を想定した装置として製作した。モノアラガイの味覚嫌悪条件づけの研究手法には大きく行動学的、電気生理学的、分子生物学的研究の3種類に分類される。これら全ての基盤となる行動学的研究には大量の実験動物個体が必要とされ、加えて、電気生理学的研究及び分子生物学的研究に移行するまでには更に多くの個体が必要となる。動物を条件づけするために必要な時間もかなりの長時間を必要とする。行動学的実験の一部を機械的装置に委ねることで電気生理学的研究及び分子生物学的研究への移行が円滑にできると考えられる。また、味覚嫌悪条件づけを機械に委ねることで実験者毎の熟練度の相違を排除し、常に一定の実験結果を得ることが期待できる。

ヨーロッパモノアラガイなどの無脊椎動物は高校生物、中学理科の「動物の行動、神経系」の授業をするための教材として検討されている(Kanazawa et al., 2008, 2010)。これら教育における教材の一部としても本装置の提案を念頭に置いている。

4.2. システム構築

4.2.1. 電気回路

本装置は電気刺激制御装置からの制御信号(TTL信号)を装置駆動に要するスイッチング信号とするために、トランジスタ(NEC Corporation; 2SC3694)回路を介して水中ポンプ及び電流刺激のスイッチングを制御するものとした。3つのチャンネルの信号を並列かつ、独立制御可能な電気刺激装置(Dia Medical System Co., Ltd.: DPS-1300D)から発生させ、1つのチ

チャンネルの信号を電気刺激制御、2つのチャンネルの信号をシヨ糖提示用に使用した。シヨ糖提示は条件づけ時と記憶テスト時に異なるプロトコルで動作させる為に2つ必要となる。シヨ糖提示に必要なそれぞれの2つのチャンネルの信号から1つの水中ポンプを駆動させる回路を設計した。シヨ糖提示(2つのチャンネルの信号)と電気刺激(1つのチャンネルの信号)を制御する3信号2回路を基本とする電気回路を構築した(Fig. 4-1)。更に、3つの信号の出力状態をWebカメラによって捉えるため、信号それぞれの出力を可視化するためのLEDを1信号1色とし、赤色(Memory-Test時シヨ糖提示)、青色(訓練時シヨ糖提示)、緑色(電気刺激)として、信号入力と同時に点灯するように設計した。また、電流刺激は9V積層乾電池を利用した。刺激出力は回路への高抵抗($1M\Omega$ と $9M\Omega$)の抵抗を挟み、 $1M\Omega$ の抵抗両端の電圧を計測して算出した結果、電流値は $0.4\mu A$ であった。

4.2.2. 装置設計と作製

装置台はメッシュネット(CAINZ Co., Ltd.)4枚を結束バンド(CAINZ Co., Ltd.)で組み合わせ、幅:90cm、奥:30cm、高:50cmの台とした。その上に縦方向に $2cm \times 10cm$ の範囲を切除した50ml遠沈管(Corning Incorporated)を結束バンドで台に固定し、モノアラガイ格納用チャンバーとした(Fig. 4-2A)。水流路は6mm(内径4mm)アクリル管と6mm(内径4mm)及び9mm(内径7mm)、12mm(内径9mm)のシリコンチューブで家庭用バスポンプ(CAINZ Co., Ltd.)に繋ぎ家庭用バスポンプ駆動時には常時置き水が $200ml/min$ で流入するようにした。この家庭用バスポンプは上記電気回路に含まれない独立駆動であり装置使用中は常に灌流される状態にした。モノアラガイ格納用チャンバーからの水流出はオーバーフロー方式で水が排水される仕様とした(Fig. 4-2B)。このチャンバーを10台並列に連結し、最大で10匹のモノアラガイを同時に条件づけることが可能となった(Fig. 4-2)。加えて、電流刺激用電極(タングステン製: $\phi 0.5mm$)は電極間距離2cmとしてモノアラガイを挟むようにチャンバー内に配置した(Fig. 4-3A)。モノアラガイはピアノ線と電子部品用金具(中継コネクタ)によって

自作したクリップにより殻を固定することで一定の位置に留めた(Fig. 4-3 B)

ショ糖の流路は水流入経路の 6mm シリコンチューブに三又分岐を設置し、更にそこに逆流防止弁を挟んで繋いだ(Fig. 4-4A)。Fig. 4-4B のようにサイフォンの原理と逆流防止弁を利用した仕組みにより、ショ糖用水中ポンプ駆動時のみショ糖が流入し、非駆動時には水が灌流され続ける仕様とした。

4.3. 方法

4.3.1. 自動装置を使用した味覚嫌悪条件づけ

実験は 24 時間絶食したモノアラガイを使用した。最初にモノアラガイの殻をクリップで固定した状態で容器内に 10 分間保持し、モノアラガイを装置の環境に慣れさせた。装置に順応後、Pre-Test として 100mM のショ糖 10ml を 10 秒間かけて水流入経路に繋いだ 10ml シリンジ(TERUMO CORPORATION,)によって与え、CS に対する咀嚼行動を 1 分間目視で計測した(咀嚼回数 : bites/min)。Pre-Test の後に 10-15 分間静置して、モノアラガイに対して条件づけを行った。条件づけ時の CS は 100mM のショ糖として 10ml を 10 秒かけて与えた。US (電気刺激 9V、0.4 μ A) の持続時間は 0.2s とした。これらを組刺激として、前章で示した組刺激回数の 15 回を中心にした 1 分間隔の組刺激を 5、10、15、20、50 回与える条件づけを行った。また、組刺激間隔の提示延長効果を調べるため、組刺激回数を 5 回として、組刺激間隔を 5min、10min、15min と各々あけて条件づけを行った。加えて、1 回の組刺激による条件づけの効果を調べるため、電気刺激時間を 0.2s、2s、5s と変化させて条件づけを行った。

条件づけ後テスト(Post-Test)は Pre-Test と同様に CS を与え、咀嚼回数を目視により 1 分間計測し記憶を評価した。記憶の評価はこれまでの方法と同じく、STM として 10 分後(Post-Test 10min)、LTM として 24 時間後(Post-Test 24h)と定義した。記憶形成の可否は、Pre-Test と

Post-Test に対する咀嚼回数の統計的な比較によって行った。

条件づけは CS-US の手順で組刺激を繰り返して行う群(Forward 群)と、US-CS の手順とする逆手順群(Backward 群; US-CS/1、15 回)の 2 群に大別して行った。Backward 群は条件づけが刺激手順に依存することを示すための対照群とした。

4.3.2. 外套膜表皮への電気刺激による LPeD11 の応答

モノアラガイ生理的食塩水(51.3mM NaCl; 1.7mM KCl; 4.1mM CaCl₂; 1.5mM MgCl₂; 5.0mM HEPES-NaOH pH7.9~8.1)中でピンセットとスプリングシザーズを使用して外套膜と中枢神経節の神経接続を保ち、他の部分を切除したセミインタクト標本を作製し、電気生理実験用の標本とした。その中枢神経節中の殻引き込み行動の介在神経細胞である LPeD11 ニューロン(Left Pedal Dorsal 11 neuron)に対し 3M-KCl を充填した細胞内記録用ガラス微小電極(50~70M Ω)を細胞内に刺入することで神経活動を観察した。得られた神経活動は細胞内記録用増幅器(Axon Instruments; AxonClamp2B)から DIGIDATA (Axon Instruments; DIGIDATA 1322A)に誘導し、その出力をコンピュータ(DELL)内の AxoScope7 (Axon Instruments)で表示し、コンピュータに記録した。外套膜への電気刺激は、電気刺激制御装置(Dia Medical System Co., Ltd.: DPS-1300D)からアイソレータ(Dia Medical System Co., Ltd.: DSP-133B)に接続し、刺激時間は電気刺激制御装置、刺激強度はアイソレータによって制御することで与えた。外套膜への電気刺激に際しては中枢神経節及び神経束の周りをワセリン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)で囲い絶縁した。刺激電極(タングステン線)は外套膜に接触しないように配置し、電極間距離 5mm とした。

4.4. 結果

4.4.1. 9V、0.4 μ A 電気刺激の効果

1000V 電気刺激と同様に 9V 電気刺激においてもモノアラガイが自動化装置に固定された状態で電気刺激時に殻引き込み行動を引き起こしてから、殻引き込みから回復する時間を調べた。実験方法は第 3 章 3.4.1 と同様にして行った。その結果、電気刺激の持続時間が 0.2 秒間の場合には 37.9 \pm 7.4s (mean \pm S.E.; n=10)、2 秒間では 54.8 \pm 9.6s (mean \pm S.E.; n=10)、5 秒間では 84.7 \pm 20.3s (mean \pm S.E.; n=10)の経過時間の後に殻引き込みから回復した。

4.4.2. 自動装置の動作

本装置の動作を確認するためにショ糖の代わりに青色色素である 0.005%メチレンブルー水溶液(JAPAN PET DESIGN Co., Ltd.)を CS 提示の間にチャンバー内に流した。また、電気刺激を行うとモノアラガイは殻へ引込むのが観察された(Fig. 4-5)。電気回路の設計通りに青色 LED 発光 (CS 提示タイミングを示す) と同時に青色色素のチャンバー内への流入が認められた(Fig. 4-5B)。10 秒間の青色色素の流入後、青色 LED の消灯の約 5 秒後に、青色色素は完全に排出された。また、緑色 LED (US 提示タイミングを示す) の発光と同時にモノアラガイの殻引き込み行動が観察され、電気刺激も設計通り動作することを確認した(Fig. 4-5C)。

4.4.3. 味覚嫌悪条件づけ自動化装置の性能評価

4.4.3.1. STM/LTM の形成

9V 電気刺激を US とする味覚嫌悪条件づけにおいて、電気刺激時間を 0.2 秒に固定した場合、組刺激回数を 1、5、10、15、20、50 回とすると、STM は組刺激回数 5~50 回の範囲

で形成され、LTM は 5～20 回の範囲で形成された(Fig. 4-6A)。そのうち 15 回の組刺激時では Pre-Test と Post-Test 24h を比較すると強固な LTM を観察したが($p<0.0001$)、Pre-Test と Poste-Test 10min を比較した STM は 5～20 回で統計的に強固になったが ($p<0.0001$)、これらの群間に STM 形成の有意水準に差はなかった。逆手順によって 15 回の組刺激を行った群では STM 及び、LTM の形成が観察されなかった(Fig. 4-6A CS-US)。なお、これら全ての実験は実験者の実働時間 1 日未満で完了された。

4.4.3.2. 組刺激間隔の延長による効果

本装置による LTM 形成のための最少組刺激回数は 5 回であった(Fig. 4-6A)。最少組刺激回数において組刺激間隔（組刺激を与えた後、次の組刺激を与えるまでの時間）を変更させたことによる記憶形成変化を調べたところ、全ての群で STM 形成に関わる有意水準は同一で、記憶強化を示すことはなかった($p<0.001$)。一方、LTM 形成に関しては、組刺激間隔 1min、10min、15min の各群では有意水準が $p<0.05$ であるのに対して、5min の群においては有意水準が $p<0.001$ であり、他の群と比較して僅かに強固な LTM 形成が形成された(Fig. 4-6B)。

4.4.3.3. 一試行条件づけ (One-trial conditioning)

電気刺激時間を 0.2 秒、2 秒、5 秒と変えて、CS (100mM ショ糖 10ml/10s)と US(電気刺激 : 9V, 0.4 μ A)の組刺激条件で一試行条件づけを行った。0.2 秒間の電気刺激では STM 及び、LTM の形成は観察されなかったが、2 秒間の電気刺激によって STM の形成を観察した($p<0.05$)。しかし、LTM の形成へは至らなかった。一方、5 秒間持続する電気刺激により STM ($p<0.0001$) 及び、LTM ($p<0.001$)が強固に形成された。一試行条件づけの US の刺激時間を 5 秒間とした逆手順(US-CS ; Backward)では STM 及び、LTM は観察されなかったことから、5 秒間の

電気刺激による長期間の単なる咀嚼行動の抑制が生じたのではなく、CS と US の時間関係が学習されたための結果であると結論した(Fig. 4-6C)。

4.4.3.4. 外套膜への電気刺激による LPeD11 の応答

上記一試行条件づけにおいて、5 秒間の持続した電気刺激が LTM の形成を引き起こしたことから 0.5–2 秒間と 5 秒間の電気刺激では学習に関わる神経細胞に及ぼす膜電位変化への効果が異なるものと予想された。異なる時間、強度の電気刺激を与えた時の殻引き込み介在ニューロンである PeD11 の膜電位変化を観察することができれば 5 秒間でのみ LTM が形成された理由を判断できると考えられた。

LPeD11 は RPeD11 と電気緊張的に接続されており (Sunada et al., 2010)、R/L PeD11 で同様の膜電位変化が測定できる。本実験結果は LPeD11 からの観察結果である(Fig. 4-7)。

モノアラガイ外套膜への 10V の電気刺激は LPeD11 において刺激持続時間を変えても約 15mV の一過性脱分極性応答を約 0.5 秒間観察した。この 15mV の静止膜電位の変化は刺激時間及び、刺激強度に依存しなかった。刺激強度を 20V から 100V とすると、活動電位の発火を観察した。インパルス数は刺激強度依存的に増加する傾向があり、刺激強度 50V から 100V ではバースト状に応答した。刺激強度 100V においては、インパルスは刺激時間中バースト状態に持続した。刺激時間を 10 秒まで延長して観察したがバースト状の応答は、その期間持続した。電気刺激時の刺激電流量は味覚嫌悪条件づけの自動化装置を使用した場合と異なる。これは、電気生理学的な実験条件下においてモノアラガイ生理的食塩水を使用する為に積層乾電池を使用した自動化装置時の刺激電流量を再現できない。その為、電気刺激にはアイソレータによって電圧量を可変した。

4.5. 考察

最大 10 匹のモノアラガイに対して、同時に味覚嫌悪条件づけを行う自動化装置を開発した。このような装置は STM と LTM を形成に必要な CS、US の詳細な条件（刺激持続時間や組刺激間隔）を設定し比較を行う上で非常に有効である。本装置の実用性はモノアラガイを使って確認された。第 1 に第 3 章において示したように、有効な 1000V 電気刺激を US とする味覚嫌悪条件づけと比べてみても、本装置は同時に大量の動物を条件づけることが可能で、9V 乾電池を刺激源とすることで簡便で手軽な装置となった。

第 3 章に示した 1000V 電気刺激を US とした味覚嫌悪条件づけを実施した装置では動物が容器内を自由に動くため、電極と動物の相対的な位置関係により、常に一定の刺激強度を与えているかはわからない。しかし、本装置ではモノアラガイの殻を固定することで、ほぼ同一刺激強度に設定可能である。モノアラガイを固定することによるストレスは殻を固定しない条件づけ（1000V 電気刺激や、機械的接触刺激を US とする味覚嫌悪条件づけ）と同様の時間設定で条件づけを獲得していたことから、本実験条件下ではこのストレスの影響は無視できるレベルであると考えられた。最大 10 匹を同時に条件づけることが可能なことから、統計検定を行う上で十分なデータ数を容易にかつ比較的短時間にしかも少ない人的労力で確保できることが本装置の実用面での大きな利点である。

4.5.1. 刺激時間延長の効果

本項で、電気刺激に対する LPeD11 の応答を計測した。PeD11 は殻引き込み行動介在ニューロンであり、皮膚への強い接触や痛覚を生ずるような化学刺激などの侵害刺激を受容し (Sunada et al., 2010, 2014; Inoue et al., 1996)、その興奮が運動ニューロンを発火させ殻引き込み行動が誘発される (Ferguson et al., 1991)。殻引き込み行動を誘発する刺激は、モノアラガイにとって侵害刺激として認識され、PeD11 に投射される。一試行条件づけの記憶形成を評

価した場合、0.2 秒及び、2 秒の電気刺激時間では LTM を形成せず、5 秒間の持続的刺激を必要とした。LPeD11 の応答を観察すると、今回テストした最大刺激強度によってバースト状のインパルスが発生した。一試行条件づけではこの 5 秒間のバースト状インパルスが重要である可能性が考えられる。しかし、自動化装置による条件づけ時の PeD11 の興奮状態は直接観察しておらず不明のため、今後、セミインタクト標本を用いて、自動化装置と同じ条件で、必要な神経組織のみによる *In Vitro* 条件づけによる検討が必要となる(Sunada et al., 2014)。 *In Vitro* 条件づけにより PeD11 の興奮状態を観察することで、LTM 形成に必要な興奮状態が評価できると予想している。

結論として、人手を介さずに CS と US をモノアラガイへ与える装置の開発ができた。これまでのモノアラガイ味覚嫌悪条件づけは人手を介さなければ条件づけを行えなかった。US に電気刺激を採用することで電気回路的な制御により動物に刺激をすることができ、その結果 US を機械的制御で行うことを可能とした。さらに、動物を固定することで動きを限定化して、人手による調節が不可欠であった動物の動きへの対応が不必要となった。加えて、自動給水による味覚刺激方法の開発ができたことでモノアラガイへのショ糖提示も機械を介して行えるようになった。今後、モノアラガイ味覚嫌悪条件づけの行動評価までも含めた完全自動化には、CS 提示後 1 分間の動物の咀嚼行動の計測が必要であり、この点に関しては画像処理技術の導入により、実行可能であろうと予想している。

図と図の説明

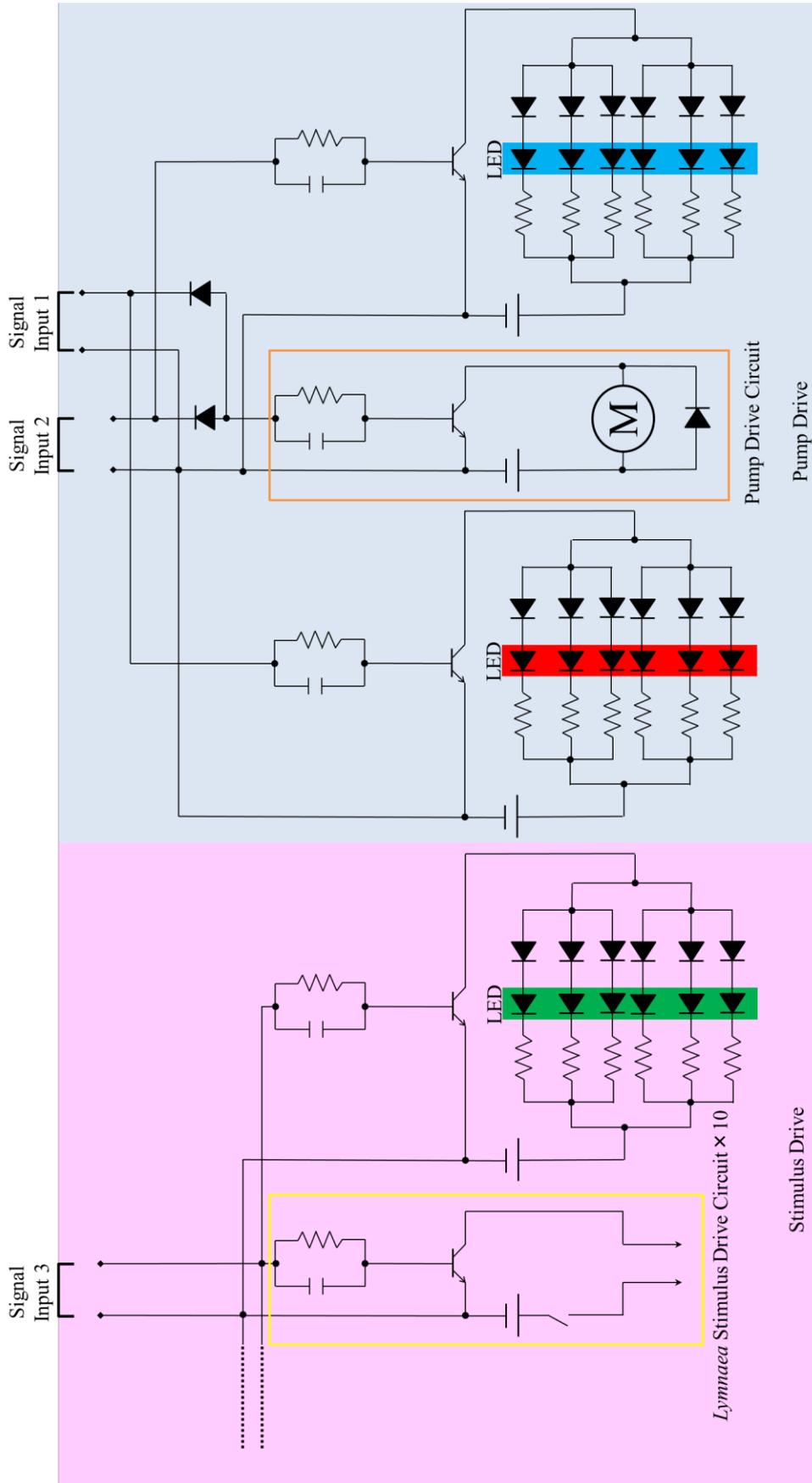
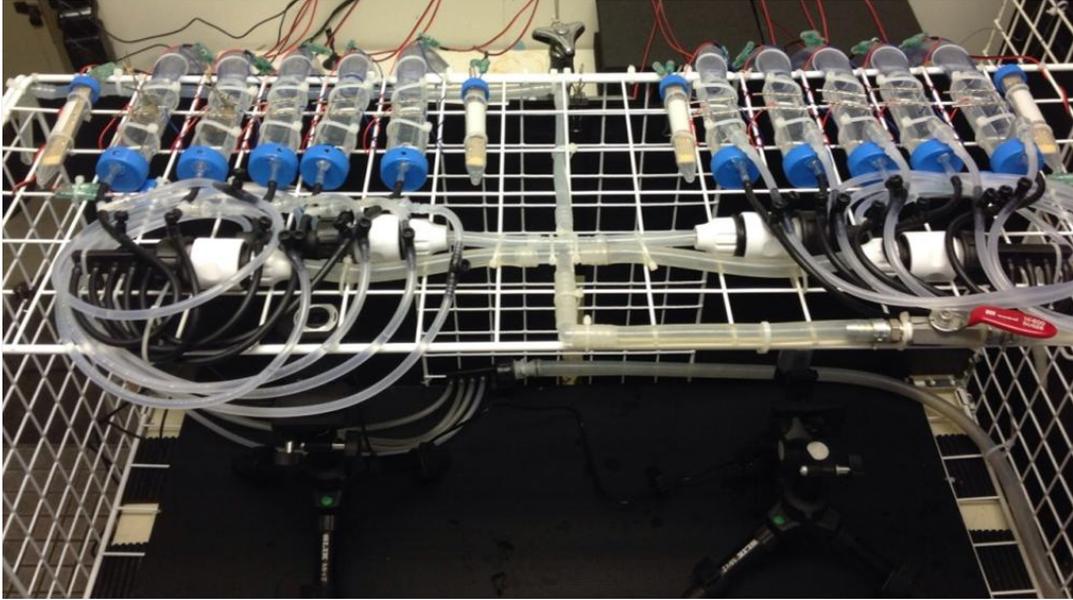


Fig.4-1 味覚嫌悪条件づけの自動化装置電気回路図

A



B

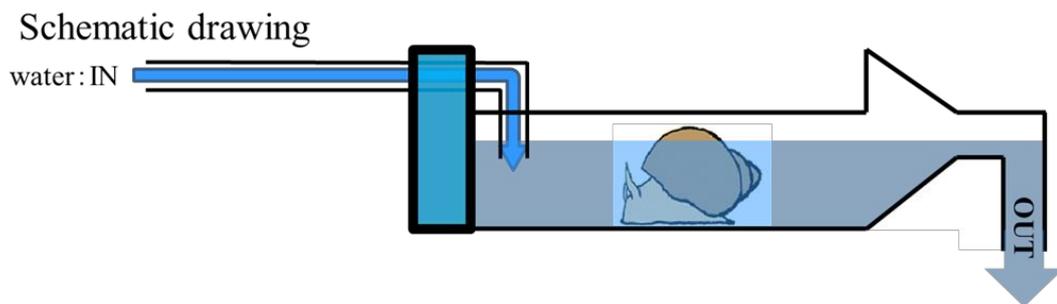
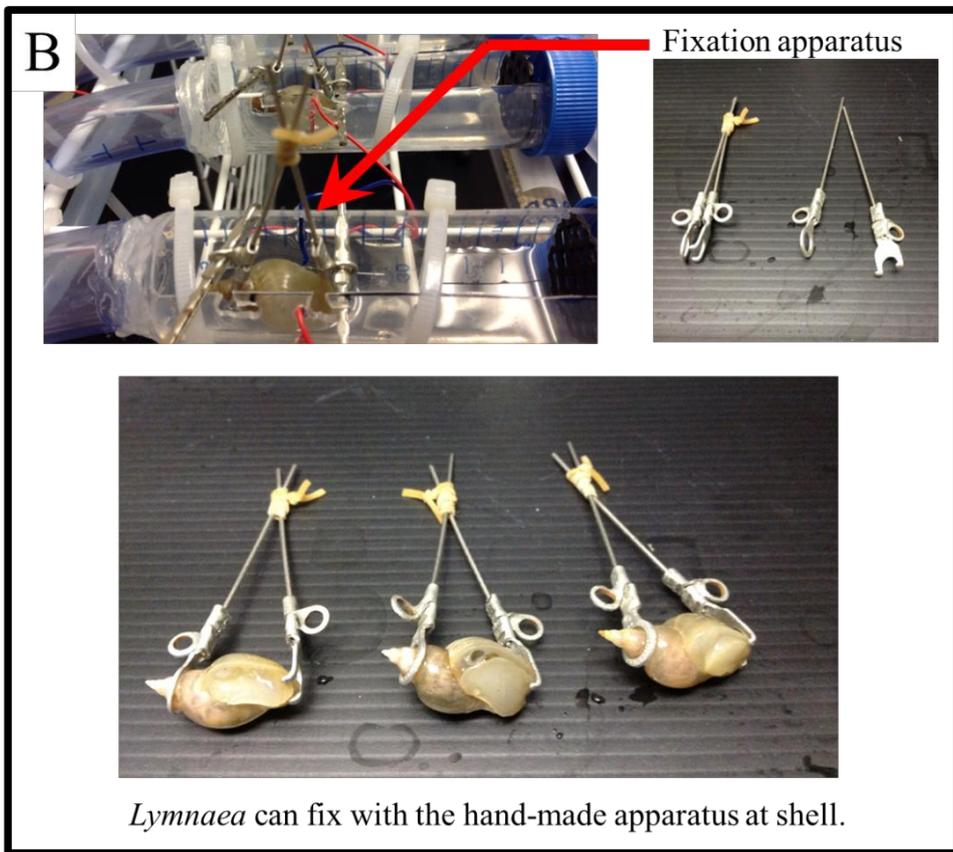
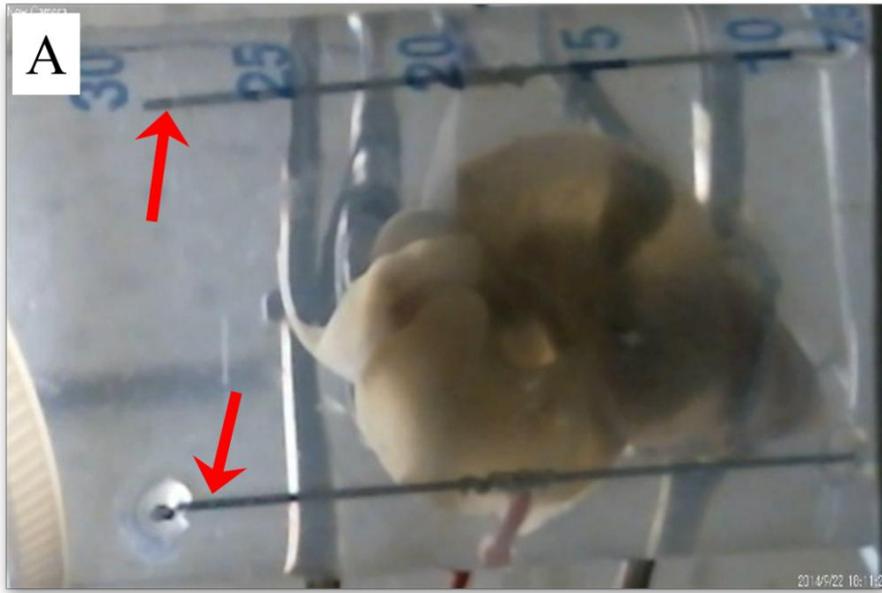


Fig. 4-2 モノアラガイによる味覚嫌悪条件づけの自動化装置
自動化装置の全体像(A)、自動化装置チャンバー内の水流路(B)



Lymnaea can fix with the hand-made apparatus at shell.

Fig. 4-3 自動化装置の電極配置とモノアラガイの固定具

自動化装置電極配置(A)、モノアラガイ刺激用電極を赤い矢印で示した。電極はモノアラガイを挟むように配置した。モノアラガイ固定用クリップ装置にクリップを固定することでモノアラガイの殻を固定した(B)。

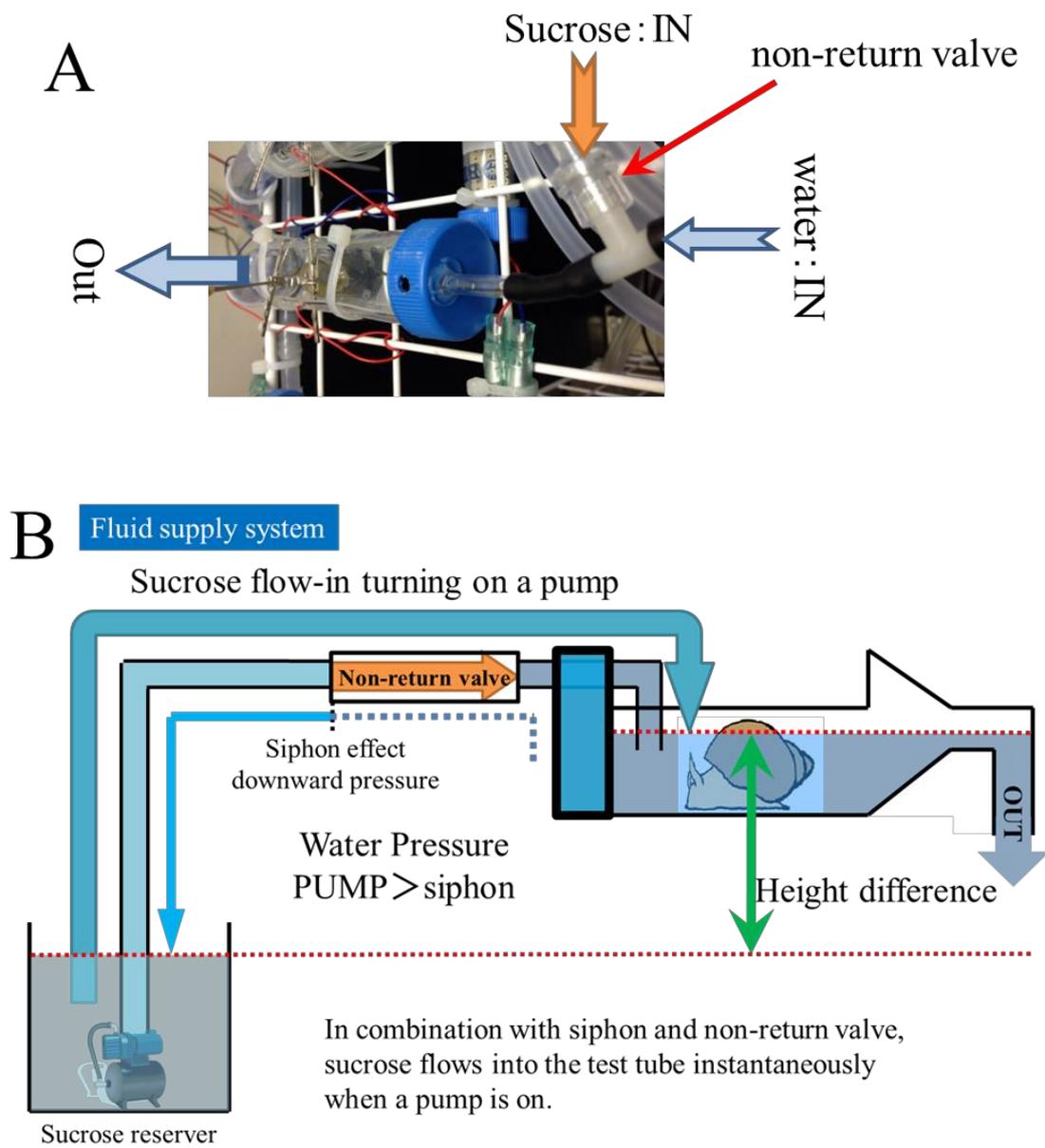


Fig. 4-4 ショ糖流入経路

ショ糖流入経路と水流入経路(A)、三又分岐に逆流防止弁を挟んでショ糖がチャンバー内に流入する。また、水の流入は A の water: IN の方から常に一定の速度で流入する。ショ糖流入原理(B)、逆流防止弁とサイフォンの原理を利用した仕組みによってショ糖ポンプ駆動時のみショ糖がチャンバー内に流入する。

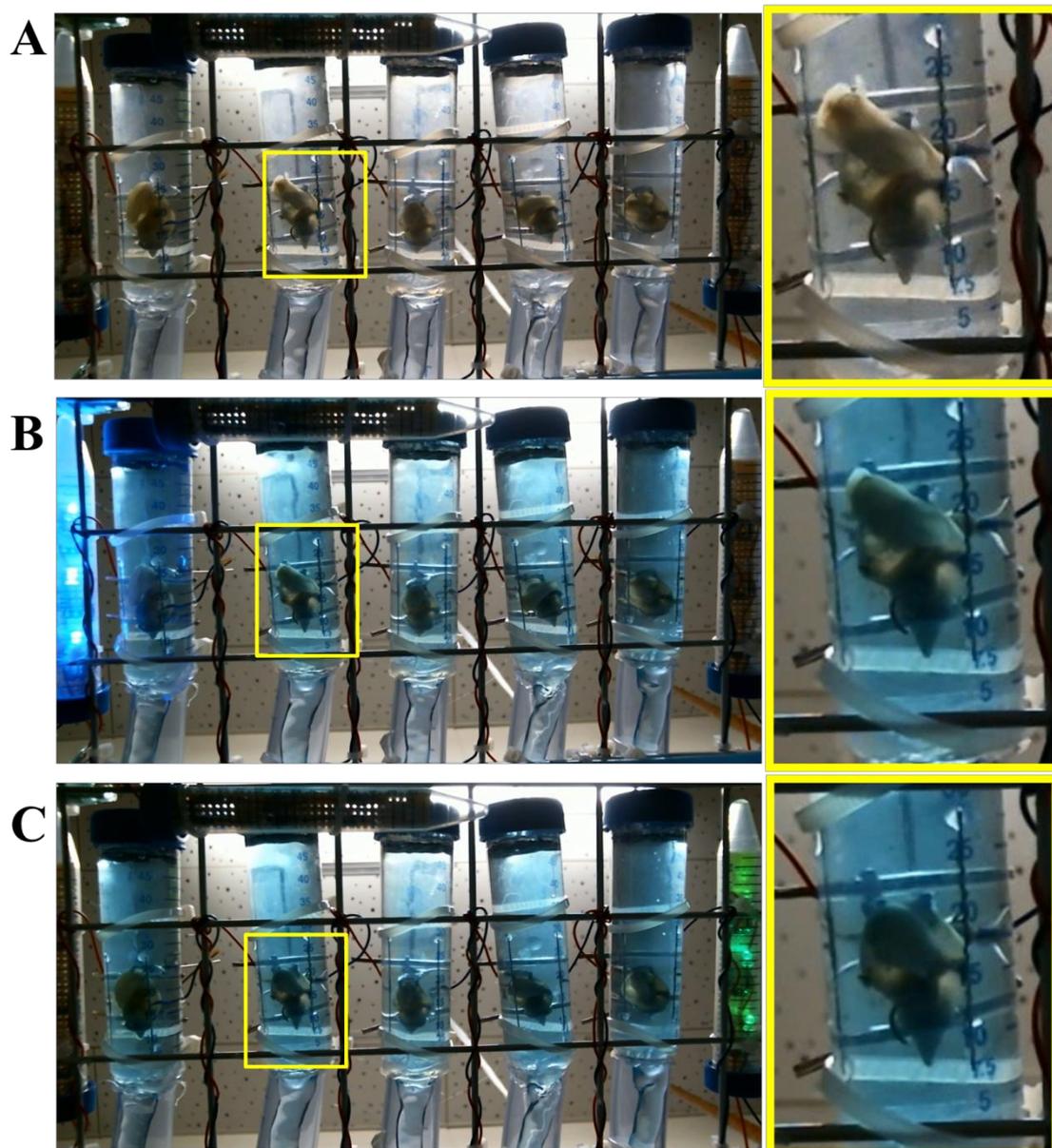


Fig. 4-5 自動化装置の動作

左図の黄枠内を拡大したものを右図に示した。水灌流時(A)。水灌流時にはLEDの発光が見られない。加えて、チャンバー内の水が着色されていないことからショ糖の流入が無いことがわかる。ショ糖の流入時(青色色素) (B)。ショ糖流入は青色LED (B画面左端)の発光と同時に観察された。電気刺激時(C)。青色LEDの消灯と同時に緑色LED (C画面右端)が発光し、電気刺激されたことによってモノアラガイの殻引き込み行動が観察された。

CS-US (1, 5, 10, 15, 20) and US-CS (15)

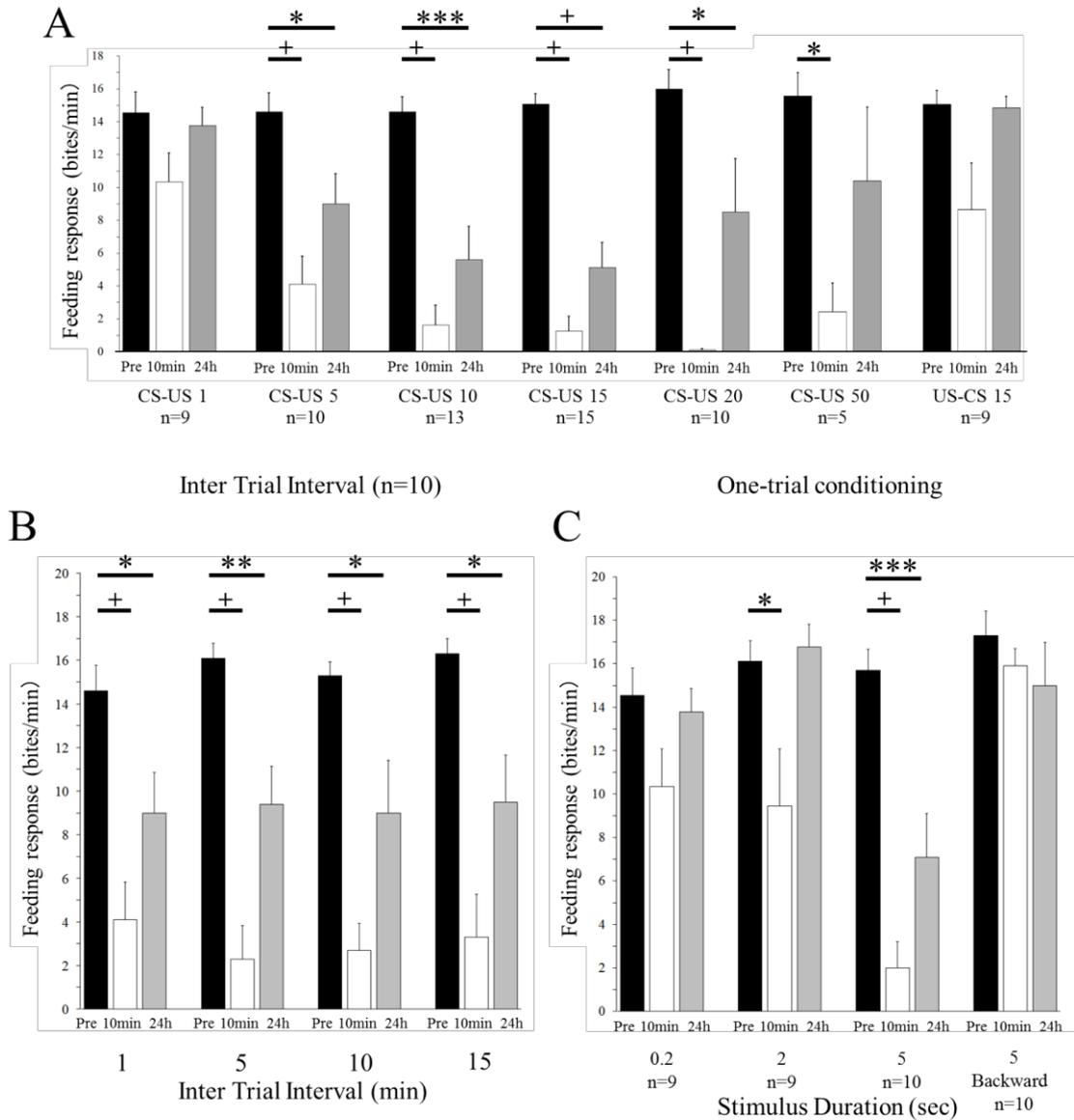


Fig. 4-6 自動化装置によるモノアラガイの味覚嫌悪条件づけ

条件づけにおいて組刺激回数を 1、5、10、15、20、50 回として Pre-Test、Post-Test 10min、Post-Test 24h のショ糖に対する咀嚼回数を比較した(A)。1 回の組刺激を除く全ての条件において STM が形成されたが、LTM の形成は 5、10、15、20 回の組刺激でのみ観察された。また、組刺激を US-CS (15 回) とする Backward 群では学習が成立しなかった。組刺激間隔の変更の効果(B)。組刺激回数は 5 回とした場合、全ての群において STM、LTM の形成が観察された。One-trial conditioning (C)。US を 0.2、2、5 秒と変化させてテストしたところ 5 秒間の US を適用することで STM、LTM が形成された。加えて、Backward 群 (刺激時間 5s) では学習が成立しなかった。

(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; + $p < 0.0001$)

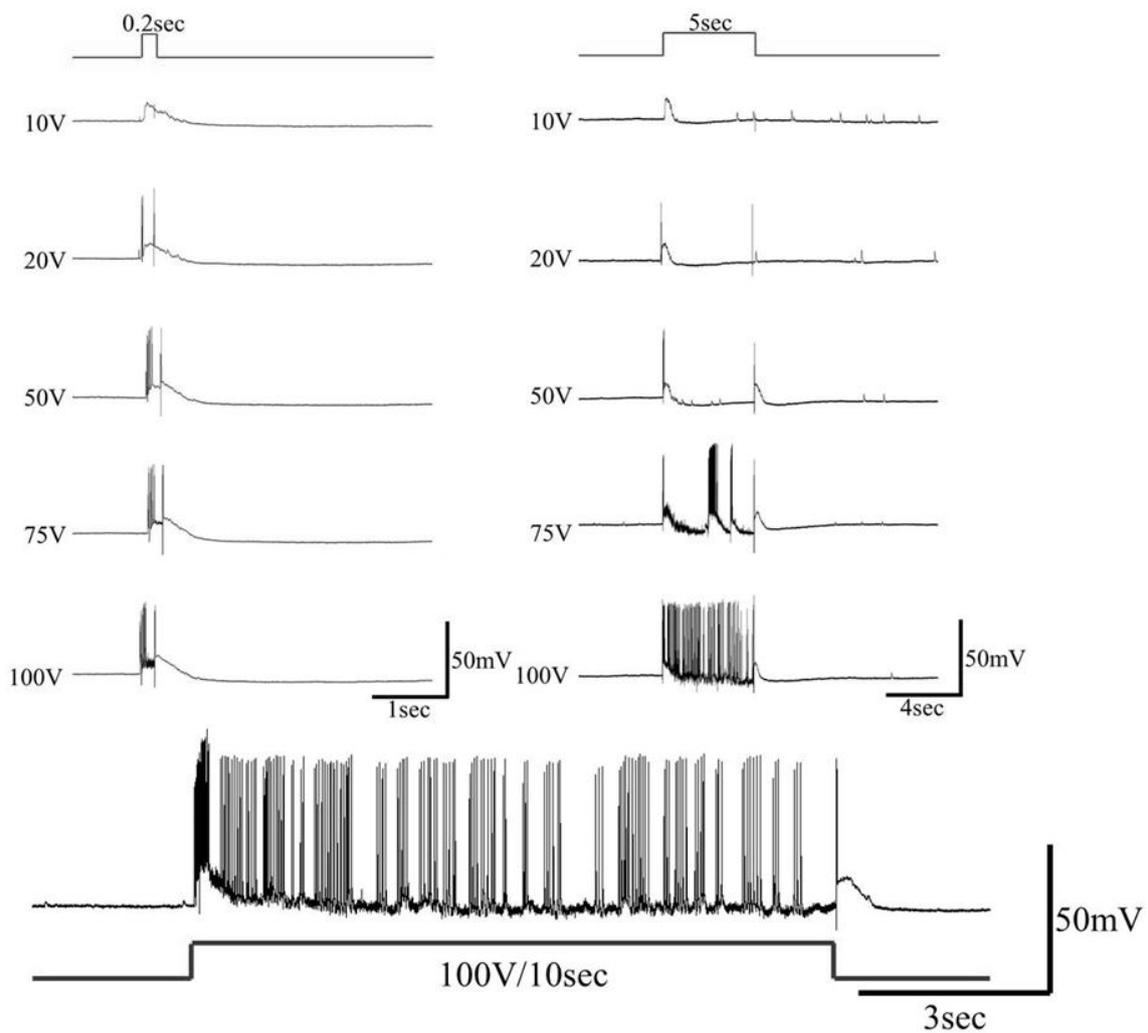


Fig. 4-7 外套膜への電気刺激の強度変化による LPeD11 の応答

外套膜への電気刺激より LPeD11 に 0.5 秒程度持続する一過性脱分極応答が観察された。電気刺激強度を上昇させることで LPeD11 に活動電位が観察された。更に、そのインパルスのスパイク数は刺激強度の増加につれて増え 100V の電気刺激では刺激時間中でバースト状に活動電位が誘発された。このバースト状発火は電気刺激時間を 10 秒に延長させても持続した。

第 5 章

総括

モノアラガイをモデル動物とした研究により以下の結果を得た。

5.1. 作業仮説の検証

記憶形成の分子的な過程に関与する神経回路内の細胞内変化は対応させることができる。一般的に記憶の形成過程は学習の数分から数十分後に STM が形成され、数時間後に ITM、数時間から長期間で LTM、更に強固な記憶として CLTM が形成される。この時、学習に関与する神経回路内の細胞では、学習直後に細胞内のイオン濃度変化、数十分から数時間の間に酵素反応の活性化、タンパク質のリン酸化が起きる。学習から数時間後ではタンパク質の新生が誘発され、数時間から 1 日後に遺伝子発現の変化、その結果として膜タンパク質が修飾されることで記憶が固定化される。これら一連の変化は段階的である。そして、これらに対応させて学習を行うことでより強固な記憶を形成させることができると考えた。

第 3 章ではキナーゼ C の活性化、記憶の冷却阻害及び分散学習を検証することでこれら一連の作業仮説を検証したといえる。キナーゼ C の活性化は作業仮説から STM 形成時に引き起こされると考えられるが、学習前に既に活性化された状態であれば学習獲得直後の神経細胞内イオン濃度の変化が極少量であっても、少ない組刺激回数で STM から ITM への移行、更には LTM の形成が促進されると考えられた。

記憶の冷却阻害では生体内の化学反応が温度依存的に行われることから冷却によってそれらが遅行化及び停止すると考えられている。モノアラガイへの冷却阻害によって学習直後、及び学習後 3 時間の冷却で記憶の形成阻害が引き起こされたことから、このタイミングで記憶形成のための酵素活性の上昇といったタンパク質が励起されている状態が予想される。学習後 3 時間についてはタンパク質の新生が引き起こされる時間帯であると考えられ、タンパク質新生と ITM が同時期であるとする作業仮説から ITM 形成が学習後 3 時間の時点であることが示唆される。これについては、3 時間の時間間隔を空けた分散学習が記憶形成を効果的に誘導したことから支持されると考えられる。

5.2. モノアラガイにおける味覚嫌悪条件づけ新たな実験系の確立

これまでにモノアラガイ味覚嫌悪条件づけにおいて US として機械的接触刺激や苦味物質の投与が使用されてきた。機械的接触刺激では刺激強度を実験者の感覚に頼らなければならない点、また、苦味物質の投与では苦味物質の洗い流しが十分にでなければならない点の 2 点が問題点であった。これらにより実験者の熟練度によるバラつきが生じてモノアラガイの条件づけ成立を妨げる要因とされた。一定強度以上の刺激を常に与えることができ、その上、刺激後洗い流す必要のない US として電気刺激を使用して味覚嫌悪条件づけを試みた。その結果、US として 0.2 秒間の電気刺激(1000V ; 80 μ A)と CS として 10 秒間のショ糖提示を組刺激とし、15 回の組刺激によって条件づけが成立した。ただし、5、8、10 回の組刺激では組刺激回数が少ないため、また、20 回の組刺激では動物にとって過剰なストレスとなった影響が考えられたため条件づけが成立しなかった。電気刺激を US とすることで実験者の熟練度によるバラつきを考慮する必要がなくなった。更に陸棲動物への電気刺激では電極に動物が接地していなければ刺激を与えることが出来ず、加えて刺激前に接触刺激を与えてしまう点が問題点と成り得た。モノアラガイは水棲のため、この導入は陸棲動物への電気刺激の適用より容易であった。そのため、実験者の熟練度に依存しないより簡易的で高精度な電気刺激が適していることを実証的に示すことができた。

5.3. 自動的味覚嫌悪条件づけの装置開発

US を電気刺激とした味覚嫌悪条件づけを確立したことで、電気刺激を電気回路へ組み込み、尚且つ CS とするショ糖提示を機械的に行うことが可能となれば味覚嫌悪条件づけを自動化することが可能であると考えられた。ショ糖提示を機械的に行うことが可能な自動給水器を開発したことにより CS を機械化することができ、これら CS と US をトランジスタと電気刺激発生装置で制御することで味覚嫌悪条件づけの自動化装置を作製し、性能を示

した。本装置の性能は、US として 0.2 秒間の電気刺激(9V : 0.4 μ A)と CS として 10 秒間で 100mM のショ糖を 10ml 提示することで 5、10、15、20 回の組刺激で条件づけが成立した。加えて、US を 5 秒間与えることで 1 回の組刺激によって条件づけを成立させる **One-trial conditioning** が可能であった。本装置を利用することで条件づけ済み動物を安定的に短時間で供給することが可能であることから今後、行動実験後に電気生理学的、分子生物学的研究への移行がより円滑に進むと考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くのご助言と懇切丁寧な指導をして頂きました東海大学工学部の榊原学教授、堀越哲郎教授の両氏に心から感謝し、厚く御礼申し上げます。また、徳島文理大学香川薬学部機能生物学講座・伊藤研究室の伊藤悦朗教授、砂田寛司博士、北海道大学大学院生命科学神経情報研究室の青沼仁志准教授、渡邊崇之博士、福岡女子大学国際文理学部の松尾亮太准教授、カナダ・カルガリー大学の Ken Lukowiak 教授、兵庫県立大学環境人間学部の岡田龍一博士、アメリカ・インディアナ大学の Joseph Farley 教授、アメリカ・ウッズホール海洋生物学研究所の Alan M. Kuzirian 教授、アメリカ・ウェストバージニア大学の Daniel L. Alkon 教授、皆様には大変多くのご助言をして頂きましたことに感謝し、厚く御礼申し上げます。

最後に、あらゆる面で私を支えて下さいました、家族、友人、東海大学開発工学部榊原・堀越研究室の先輩、後輩の皆様に感謝し、厚く御礼申し上げます。

参考文献

Abraham WC, Williams JM. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem.* 89(3):260-8. 2008

Abraham WC. Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 9(5):387. 2008

Alberini CM, Chen DY. Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci.* 35(5):274-83. 2012

Alkon DL, Epstein H, Kuzirian A, Bennett MC, Nelson TJ. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(45):16432-7. 2005

Alkon DL, Nelson TJ, Zhao W, Cavallaro S. Time domains of neuronal Ca^{2+} signaling and associative memory: Steps through a calyculin, ryanodine receptor, K^+ channel cascade. *Trends Neurosci.* 21(12):529-37. Review. 1998

Alkon DL, Rasmussen H. A spatial-temporal model of cell activation. *Science.* 239(4843):998-1005. Review. 1988

Alkon DL, Sakakibara M, Forman R, Harrigan J, Lederhendler I, Farley J. Reduction of two voltage-dependent K^+ currents mediates retention of a learned association. *Behav Neural Biol.* 44(2):278-300. 1985

Alkon DL. *Memory Traces in the Brain.* New York: Cambridge University Press.

Alkon DL, Bank B, Naito S, Chen C, Ram J. Inhibition of protein synthesis prolongs Ca^{2+} -mediated reduction of K^+ currents in molluscan neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(19):6948-52. 1987

Anokhin KV, Rose SP. Learning-induced Increase of Immediate Early Gene Messenger RNA in the Chick Forebrain. *Eur J Neurosci.* 3(2):162-167. 1991

Anokhin KV, Mileusnic R, Shamakina IY, Rose SP. Effects of early experience on c-fos gene expression in the chick forebrain. *Brain Res.* 544(1):101-7. 1991

Azami S, Wagatsuma A, Sadamoto H, Hatakeyama D, Usami T, Fujie M, Koyanagi R, Azumi K, Fujito Y, Lukowiak K, Ito E. Altered gene activity correlated with long-term memory formation of conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *J Neurosci Res.* 84(7):1610-20. 2006

Bank B, DeWeer A, Kuzirian AM, Rasmussen H, Alkon DL. Classical conditioning induces long-term translocation of protein kinase C in rabbit hippocampal CA1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(6):1988-92. 1988

Benjamin PR, Staras K, Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learn Mem.* 7(3):124-31. Review. 2000

Botzer D, Markovich S, Susswein AJ. Multiple memory processes following training that a food is inedible in *Aplysia*. *Learn Mem.* 5(3):204-19. 1998

Braun MH, Lukowiak K. Intermediate and long-term memory are different at the neuronal level in *Lymnaea stagnalis* (L.). *eurobiol Learn Mem.*;96(2):403-16. 2011

Browning K, Lukowiak K. Ketamine inhibits long-term, but not intermediate-term memory formation in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience.* 155(3):613-25. 2008

Calabrese EJ. Converging concepts: Adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis. *Crit Rev Toxicol.* 38(5):453-62. Review. 2008

Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER. Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol.* 20(1):1-9. 1989

Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature.* 469(7331):491-7. 2011

Chono K, Fujito Y, Ito E. Non-ocular dermal photoreception in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Brain Res.* 951(1):107-12. 2002

Crow T, Xue-Bian JJ, Siddiqi V, Kang Y, Neary JT. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by one-trial and multi-trial classical conditioning. *J Neurosci.* 18(9):3480-7. 1998

Crow T, Xue-Bian JJ. Proteomic analysis of short- and intermediate-term memory in *Hermissenda*. *Neuroscience*. 192:102-11. 2011

Dalesman S, Braun MH, Lukowiak K. Low environmental calcium blocks long-term memory formation in a freshwater pulmonate snail. *Neurobiol Learn Mem*. 95(4):393-403. 2011

Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull*. 96(3):518-59. 1984

DeZazzo J, Tully T. Dissection of memory formation: From behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci*. 18(5):212-8. Review. 1995

Epstein HT, Child FM, Kuzirian AM, Alkon DL. Time windows for effects of protein synthesis inhibitors on Pavlovian conditioning in *Hermissenda*: Behavioral aspects. *Neurobiol Learn Mem*. 79(2):127-31. 2003

Epstein HT, Kuzirian AM, Child FM, Alkon DL. Two different biological configurations for long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. 81(1):12-8. 2004

Etcheberrigaray R, Tan M, Dewachter I, Kuipéri C, Van der Auwera I, Wera S, Qiao L, Bank B, Nelson TJ, Kozikowski AP, Van Leuven F, Alkon DL. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(30):11141-6. 2004

Farley J, Schuman E. Protein kinase C inhibitors prevent induction and continued expression of cell memory in *Hermissenda* type B photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(5):2016-20. 1991

Ferguson GP, Benjamin PR. The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. II. Activation of central motoneurons and muscles by sensory input. *J Exp Biol*. 158:97-116. 1991

Ferguson GP, Benjamin PR. The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. I. Identification of central motoneurons and muscles. *J Exp Biol*. 158:63-95. 1991

Flexner LB, Flexner JB. Effect of acetoxycycloheximide and of an acetoxycycloheximide-puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 55(2):369-74. 1966

Frankland PW, Josselyn SA. Neuroscience: Memory and the single molecule. *Nature*. 493(7432):312-3. 2013

Fruson L, Dalesman S, Lukowiak K. A flavanol present in cocoa ((-)-epicatechin) enhances snail memory. *J Exp Biol*. 215(Pt 20):3566-76. 2012

Fulton D, Condro MC, Pearce K, Glanzman DL. The potential role of postsynaptic phospholipase C activity in synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *J Neurophysiol*. 100(1):108-16. 2008

Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ, Benjamin PR. A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci*. 21(5):1347-58. 2005

Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ, Benjamin PR. Time-window for sensitivity to cooling distinguishes the effects of hypothermia and protein synthesis inhibition on the consolidation of long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. 90(4):651-4. 2008

Guan Z, Kim JH, Lomvardas S, Holick K, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH. P38 MAP kinase mediates both short-term and long-term synaptic depression in *aplysia*. *J Neurosci*. 23(19):7317-25. 2003

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J Neurosci*. 21(14):5089-98. 2001

Hatakeyama D, Okuta A, Otsuka E, Lukowiak K, Ito E. Consolidation of long-term memory by insulin in *Lymnaea* is not brought about by changing the number of insulin receptors. *Commun Integr Biol*. 6(3):e23955. 2013

Hawkins RD, Kandel ER, Bailey CH. Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. *Biol Bull*. 210(3):174-91. Review. 2006

Hermann Ebbinghaus. *Memory: A Contribution to Experimental Psychology*. Translated by Henry A. Ruger & Clara E. Bussenius (1913) Originally published in New York by Teachers College, Columbia University. 1885

Hongpaisan J, Alkon DL. A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(49):19571-6. Epub 2007

Inoue T, Takasaki M, Lukowiak K, Syed NI. Identification of a putative mechanosensory neuron in *Lymnaea*: characterization of its synaptic and functional connections with the whole-body withdrawal interneuron. *J Neurophysiol*. 76(5):3230-8. 1996

Ito E, Kojima S, Lukowiak K, Sakakibara M. From likes to dislikes: Conditioned taste aversion in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Can J Zool*, 91(6):405–412. 2013

Ito E, Yamagishi M, Takigami S, Sakakibara M, Fujito Y, Lukowiak K. The Yerkes-Dodson law and appropriate stimuli for conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *J Exp Biol*. 218(Pt 3):336-9. 2015

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*. 4(3):289-96. 2001

Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294(5544):1030-8. Review. 2001

Kandel ER, Brunelli M, Byrne J, Castellucci V. A common presynaptic locus for the synaptic changes underlying short-term habituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 40:465-82. 1976

Kawai R, Sunada H, Horikoshi T, Sakakibara M. Conditioned taste aversion with sucrose and tactile stimuli in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem*. 82(2):164-8. 2004

Kennedy CD, Houmes SW, Wyrick KL, Kammerzell SM, Lukowiak K, Sorg BA. Methamphetamine enhances memory of operantly conditioned respiratory behavior in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol*. 213(Pt 12):2055-65. 2010

Kiss T, Pirger Z, Kemenes G. Food-aversive classical conditioning increases a persistent sodium current in molluscan withdrawal interneurons in a transcription dependent manner. *Neurobiol Learn Mem*. 92(1):114-9. 2009

Kojima S, Yamanaka M, Fujito Y, Ito E. Differential neuroethological effects of aversive and appetitive reinforcing stimuli on associative learning in *Lymnaea stagnalis*. *Zool Sci*, 13(6):803–812. 1996

Kuzirian AM, Epstein HT, Gagliardi CJ, Nelson TJ, Sakakibara M, Taylor C, Scioletti AB, Alkon DL. Bryostatins enhance memory in *Hermissenda*. *Biol Bull*. 210(3):201-14. 2006

Lee AM, Kanter BR, Wang D, Lim JP, Zou ME, Qiu C, McMahon T, Dadgar J, Fischbach-Weiss SC, Messing RO. Prkcz null mice show normal learning and memory. *Nature*. 493(7432):416-9. 2013

Lukowiak K, Adatia N, Krygier D, Syed N. Operant conditioning in *Lymnaea*: evidence for intermediate- and long-term memory. *Learn Mem*. 7(3):140-50. 2000

Lukowiak K, Orr M, de Caigny P, Lukowiak KS, Rosenegger D, Han JI, Dalesman S. Ecologically relevant stressors modify long-term memory formation in a model system. *Behav Brain Res*. 214(1):18-24. 2010

Lukowiak K, Ringseis E, Spencer G, Wildering W, Syed N. Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol*. 199(Pt 3):683-91. 1996

Lukowiak K, Sunada H, Teskey M, Lukowiak K, Dalesman S. Environmentally relevant stressor alter memory formation in the pond snail *Lymnaea*. *J Exp Biol*. 217(Pt 1):76-83. 2014

Marra V, O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes I. Susceptibility of memory consolidation during lapses in recall. *Nat Commun*. 4:1578. 2013

Martens K, Amarell M, Parvez K, Hittel K, De Caigny P, Ito E, Lukowiak K. One-trial conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem*. 88(2):232-42. 2007

Martens KR, De Caigny P, Parvez K, Amarell M, Wong C, Lukowiak K. Stressful stimuli modulate memory formation in *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem*. 87(3):391-403. 2007

Maximova OA, Balaban PM. Neuronal correlates of aversive learning in command neurons for avoidance behavior of *Helix lucorum L*. *Brain Res*. 292(1):139-49. 1984

McComb C, Rosenegger D, Varshney N, Kwok HY, Lukowiak K. Operant conditioning of an in vitro CNS-pneumostome preparation of *Lymnaea*. *Neurobiol Learn Mem.* 84(1):9-24. 2005

Michel M, Green CL, Eskin A, Lyons LC. PKG-mediated MAPK signaling is necessary for long-term operant memory in *Aplysia*. *Learn Mem.* 18(2):108-17. 2011

Michel M, Green CL, Gardner JS, Organ CL, Lyons LC. Massed training-induced intermediate-term operant memory in *Aplysia* requires protein synthesis and multiple persistent kinase cascades. *J Neurosci.* 32(13):4581-91. 2012

Michel M, Kemenes I, Müller U, Kemenes G. Different phases of long-term memory require distinct temporal patterns of PKA activity after single-trial classical conditioning. *Learn Mem.* 15(9):694-702. 2008

Mizumori SJ, Sakai DH, Rosenzweig MR, Bennett EL, Wittreich P. Investigations into the neuropharmacological basis of temporal stages of memory formation in mice trained in an active avoidance task. *Behav Brain Res.* 23(3):239-50. 1987

Mozzachiodi R, Lorenzetti FD, Baxter DA, Byrne JH. Changes in neuronal excitability serve as a mechanism of long-term memory for operant conditioning. *Nat Neurosci.* 11(10):1146-8. 2008

Murakami J, Okada R, Sadamoto H, Kobayashi S, Mita K, Sakamoto Y, Yamagishi M, Hatakeyama D, Otsuka E, Okuta A, Sunada H, Takigami S, Sakakibara M, Fujito Y, Awaji M, Moriyama S, Lukowiak K, Ito E. Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci.* 33(1):371-83. 2013

Nelson TJ, Cavallaro S, Yi CL, McPhie D, Schreurs BG, Gusev PA, Favit A, Zohar O, Kim J, Beushausen S, Ascoli G, Olds J, Neve R, Alkon DL. Calcexcitin: a signaling protein that binds calcium and GTP, inhibits potassium channels, and enhances membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(24):13808-13. 1996

Nelson TJ, Collin C, Alkon DL. Isolation of a G protein that is modified by learning and reduces potassium currents in *Hermisenda*. *Science.* 247(4949 Pt 1):1479-83. 1990

Olds JL, Anderson ML, McPhie DL, Staten LD, Alkon DL. Imaging of memory-specific changes in the distribution of protein kinase C in the hippocampus. *Science.* 245(4920):866-9. 1989

Ono M, Kawai R, Horikoshi T, Yasuoka T, Sakakibara M. Associative learning acquisition and retention depends on developmental stage in *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem.* 78(1):53-64. 2002

Orr MV, Hittel K, Lukowiak K. Predator detection enables juvenile *Lymnaea* to form long-term memory. *J Exp Biol.* 213(2):301-7. 2010

Pankey S, Sunada H, Horikoshi T, Sakakibara M. Cyclic nucleotide-gated channels are involved in phototransduction of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Physiol B.* 180(8):1205-11. 2010

Parvez K, Stewart O, Sangha S, Lukowiak K. Boosting intermediate-term into long-term memory. *J Exp Biol.* 208(Pt 8):1525-36. 2005

Pascale A, Amadio M, Scapagnini G, Lanni C, Racchi M, Provenzani A, Govoni S, Alkon DL, Quattrone A. Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC alpha-dependent pathway. *Proceedings of National Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(34), 12065-70. 2005

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 313(5790):1141-4. 2006

Quattrone A, Pascale A, Nogue X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11668-73. 2001

Ramirez RR, Gandhi CC, Muzzio IA, Matzel LD. Protein synthesis-dependent memory and neuronal enhancement in *Hermissenda* are contingent on parameters of training and retention. *Learn Mem.* 4(6):462-77. 1998

Rosenegger D, Parvez K, Lukowiak K. Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiol Learn Mem.* 90(3):544-52. 2008

Rosenzweig MR, Bennett EL, Colombo PJ, Lee DW, Serrano PA. Short-term, intermediate-term, and long-term memories. *Behav Brain Res.* 57(2):193-8. Review. 1993

Sadamoto H, Sato H, Kobayashi S, Murakami J, Aonuma H, Ando H, Fujito Y, Hamano K, Awaji M, Lukowiak K, Urano A, Ito E. CREB in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: Cloning, gene expression, and function in identifiable neurons of the central nervous system. *J Neurobiol.* 58(4):455-66. 2004

Sakakibara M, Aritaka T, Iizuka A, Suzuki H, Horikoshi T, Lukowiak K. Electrophysiological responses to light of neurons in the eye and statocyst of *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol.* 93(1):493-507. 2005

Sakakibara M, Kawai R, Kobayashi S, Horikoshi T. Associative learning of visual and vestibular stimuli in *Lymnaea*. *Neurobiol Learn Mem.* 69(1):1-12. 1998

Sakakibara M. Comparative study of visuo-vestibular conditioning in *Lymnaea stagnalis*. *Biol Bull.* 210(3):298-307. Review. 2006

Sangha S, McComb C, Lukowiak K. Forgetting and the extension of memory in *Lymnaea*. *J Exp Biol.* 206(Pt 1):71-7. 2003

Sangha S, Morrow R, Smyth K, Cooke R, Lukowiak K. Cooling blocks ITM and LTM formation and preserves memory. *Neurobiol Learn Mem.* 80(2):130-9. 2003

Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci.* 23(22):8034-40. 2003

Sangha S, Scheibenstock A, McComb C, Lukowiak K. Intermediate and long-term memories of associative learning are differentially affected by transcription versus translation blockers in *Lymnaea*. *J Exp Biol.* 206(Pt 10):1605-13. 2003

Sangha S, Scheibenstock A, Morrow R, Lukowiak K. Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci.* 23(30):9842-51. 2003

Schafe GE, LeDoux JE. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdale. *J Neurosci.* 20(18):RC96. 2000

Sekiguchi T, Yamada A, Suzuki H. Reactivation-dependent changes in memory states in the terrestrial slug *Limax flavus*. *Learn Mem.* 4(4):356-64. 1997

Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science.* 317(5840):951-3. 2007

Sherff CM, Carew TJ. Parallel somatic and synaptic processing in the induction of intermediate-term and long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(19):7463-8. 2004

Smith JB, Smith L, Pettit GR. Bryostatins: Potent, new mitogens that mimic phorbol ester tumor promoters. *Biochem Biophys Res Commun.* 132(3):939-45. 1985

Staras K, Kemenes G, Benjamin PR. Neurophysiological correlates of unconditioned and conditioned feeding behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol.* 79(6):3030-40. 1998

Stoll CJ. Sensory systems involved in the shadow response of *Lymnaea stagnalis* (L.) as studied with the use of habituation phenomena. *Proc. K. Ned. Akad. Wet. C,* 75:342-351. 1972

Stough S, Shobe JL, Carew TJ. Intermediate-term processes in memory formation. *Curr Opin Neurobiol.* 16(6):672-8. 2006

Sugai R, Shiga H, Azami S, Watanabe T, Sadamoto H, Fujito Y, Lukowiak K, Ito E. Taste discrimination in conditioned taste aversion of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol.* 209(Pt 5):826-33. 2006

Sugai R, Azami S, Shiga H, Watanabe T, Sadamoto H, Kobayashi S, Hatakeyama D, Fujito Y, Lukowiak K, Ito E. One-trial conditioned taste aversion in *Lymnaea*: good and poor performers in long-term memory acquisition. *J Exp Biol.* 210(Pt 7):1225-37. 2007

Sun MK, Alkon DL. Protein kinase C activators as synaptogenic and memory therapeutics. *Arch Pharm (Weinheim).* 342(12):689-98. 2009

Sun MK, Alkon DL. Synergistic effects of chronic bryostatin-1 and alpha-tocopherol on spatial learning and memory in rats. *Eur J Pharmacol.* 584(2-3):328-37. 2008

Sunada H, Horikoshi T, Lukowiak K, Sakakibara M. Increase in excitability of RPeD11 results in memory enhancement of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis* by predator-induced stress. *Neurobiol Learn Mem.* 94(2):269-77. 2010

Sunada H, Sakaguchi T, Horikoshi T, Lukowiak K, Sakakibara M. The shadow-induced withdrawal response, dermal photoreceptors, and their input to the higher-order interneuron RPeD11 in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol.* 213(Pt 20):3409-15. 2010

Sunada H, Takigami S, Lukowiak K, Sakakibara M. Electrophysiological characteristics of feeding-related neurons after taste avoidance Pavlovian conditioning in *Lymnaea stagnalis*. *BIOPHYSICS.* Vol.10, pp.121-133, 2014

Sutton MA, Masters SE, Bagnall MW, Carew TJ. Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in *Aplysia*. *Neuron.* 31(1):143-54. 2001

Takahashi T, Takigami S, Sunada H, Lukowiak K, Sakakibara M. Critical period of memory enhancement during taste avoidance conditioning in *Lymnaea stagnalis*. *PLoS One.* 8(10): e75276. 2013

Takigami S, Sunada H, Horikoshi T, Sakakibara M. Morphological and physiological characteristics of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *BIOPHYSICS.* Vol.10, pp.77-88, 2014a

Takigami S, Sunada H, Lukowiak K, Ito E, Sakakibara M. An automated learning apparatus for classical conditioning of *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci Methods.* 259:115-21. 2016

Takigami S, Sunada H, Lukowiak K, Kuzirian AM, Alkon DL, Sakakibara M. Protein kinase C mediates memory consolidation of taste avoidance conditioning in *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem.* 111:9-18. 2014b

Takigami S, Sunada H, Lukowiak K, Sakakibara M. High voltage with little current as an unconditional stimulus for taste avoidance conditioning in *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Lett.* 555:149-53. 2013a

Takigami S, Sunada H, Lukowiak K, Sakakibara M. Spaced taste avoidance conditioning in *Lymnaea*. *Neurobiol Learn Mem.* 107:79-86. 2014c

Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci.* 4(8):813-8. 2001

Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Haganir RL. PKM-zeta is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature.* 493(7432):420-3. 2013

Wilkinson SE, Parker PJ, Nixon JS. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J.* 294 (Pt 2):335-7. 1993

Wüstenberg D, Gerber B, Menzel R. Short communication: Long-but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci.* 10(8):2742-5. 1998

Xia SZ, Feng CH, Guo AK. Temporary amnesia induced by cold anesthesia and hypoxia in *Drosophila*. *Physiol Behav.* 65(4-5):617-23. 1999

Yamada A, Sekiguchi T, Suzuki H, Mizukami A. Behavioral analysis of internal memory states using cooling-induced retrograde amnesia in *Limax flavus*. *J Neurosci.* 12(3):729-35. 1992

Yao Y, Kelly MT, Sajikumar S, Serrano P, Tian D, Bergold PJ, Frey JU, Sacktor TC. PKM zeta maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimide-sensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. *J Neurosci.* 28(31):7820-7. 2008

Yerkes RM, Dodson JD. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol.* 18(5):459-482. 1908

金澤 昭良. ナメクジなどの軟体動物を用いた「動物の行動」の教材化ー学習・記憶を検証できる実験の開発を目指してー. 北海道立教育研究所附属理科教育センター 研究紀要 第22号. 2010

金澤 昭良. ヨーロッパモノアラガイの教材化. 北海道立教育研究所附属理科教育センター 研究紀要 第20号. 2008

滝上 慧、榊原 学. 電気刺激を無条件刺激とする味覚嫌悪条件づけの特徴. 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌) IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems. Vol. 134 No.7, pp.887-890, 2014d

滝上 慧、榊原 学. 電気刺激を無条件刺激とする味覚嫌悪条件づけ. 平成25年電気学会
電子・情報・システム部門大会講演論文集. TC1-19, 2013b