

学位論文題名

Neuroethological Analyses of Associative Learning
in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイにおける連合学習の神経行動学的解析)

学位論文内容の要旨

動物の学習およびその記憶の保持に関わる神経メカニズムの研究は、現在の神経生物学において最も関心の高い分野の一つであり、学習能力の高い脊椎動物を中心にさまざまな動物を用いて進められている。しかしながら、脊椎動物の中樞神経系は膨大な数の神経細胞から成る非常に複雑なシステムであるため、「学習による行動の変化—神経回路の変化—シナプス伝達効率の変化」といった階層的つながりを追うことが難しく、その結果、各階層に限定された研究のみが行なわれている。一方、カタツムリなどの軟体動物腹足類は、非常に大きな神経細胞を含む単純な神経系をもつにもかかわらず、連合学習などの比較的高度な学習をすることが知られている。したがって、上記の階層性に沿った解析が可能であり、学習行動の基礎となる神経機構を直接的に見出すことができると考えられる。そこで本研究では、軟体動物腹足類のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を用いて、連合学習の神経メカニズムの神経行動学的を行なった。

第1章では、始めにモノアラガイにおいて物理的および化学的刺激に対する応答を解析し、学習実験に用いる嗜好性、中性、および忌避性の各刺激を選択した。刺激の嗜好性および忌避性は、モノアラガイの咀嚼応答および殻への体の引き込み応答によって判定した。次にそれらの刺激を用いて、嗜好性および忌避性の連合学習(古典的条件づけ)がモノアラガイにおいて成立することを示した。そして、それらの行動学的解析から、嗜好性学習と忌避性学習について次のような行動学的性質を明らかにした。1) 忌避性学習には2つのタイプ(タイプ1, タイプ2)があり、学習の訓練初期にはタイプ1が、さらに訓練を重ねるとタイプ2が現れる。2) タイプ1忌避性学習の記憶は1ヶ月以上保持されるが、タイプ2の記憶は数日間で消失する。3) 嗜好性学習は、タイプ2忌避性学習と同様の行動学的性質を持つ(学習に多くの訓練を必要とするがその記憶は数日で消失する)。また、これらの行動実験の結果をもとに、嗜好性および忌避性学習のためのニューロモジュレーションモデルを考え、それらの学習の神経機構解明のための作業仮説を提出した。

第2章では、第1章の古典的条件づけより高次の連合学習である感性予備条件づけがモノアラガイにおいて成立することを示した。また、その際にはmassed(集中)およびspaced(分散)と呼ばれる二つの訓練方法を用い、それらの訓練方法による学習の行動学的性質についても解析した。

第3章では、第1章で示した学習のうち忌避性学習の一種である味覚嫌悪学習に注目し、そのニューロモジュレーションモデルの妥当性を検証するため、電気生理学実験による解析を行なった。モノアラガイはショ糖溶液に対し咀嚼応答を行なうが、塩化カリウム溶液に対しては体を殻の中へ引き込む忌避性の応答を示す。味覚嫌悪学習は、ショ糖と塩化カリウムを連続して繰り返し与えることによりモノアラガイにおいてそれらの刺激を連合させ、ショ糖による咀

嚼応答を抑制させるという学習である。第1章において示した味覚嫌悪学習のニューロモジュレーションモデルでは、味覚嫌悪学習の訓練によりモノアラガイの中樞神経系においてショ糖および塩化カリウムの味覚情報が連合し、結果として咀嚼応答を抑制する神経経路が増強するものと説明される。一方、咀嚼応答および体の殻への引き込み応答に関する神経回路は、モノアラガイでは比較的良く研究されており、咀嚼応答を司るCentral Pattern Generator (CPG)やその機能を調節するCPG調節神経細胞などが同定されている。これらの知見から、ショ糖および塩化カリウムの感覚情報はCPG調節神経細胞の1つであるCerebral Giant Cell (CGC)で連合され、CGCからCPGの介在神経細胞の1つであるNeuron 1 Medial (N1M)細胞への抑制性の入力が増強することが予想された。そこで、味覚嫌悪学習によって咀嚼応答が抑制された個体において、CGCを脱分極刺激した時のN1M細胞での抑制性シナプス後電位 (IPSP) を調べた結果、その振幅および持続時間がコントロール個体に比べて有意に増大していることを見出した。また中樞神経系を唇および触角とつなげたまま単離したsemi-intact標本を用いることにより、ショ糖および塩化カリウムの感覚情報が共にCGCに入力することも明らかとなった。これらの結果から、ニューロモジュレーションモデルの妥当性を部分的に裏付けることができた。

上記のN1M細胞におけるIPSPの増強は、味覚嫌悪学習の素過程の一つであることが示唆された。しかし、学習機構のより詳細な解明のためには、学習に関わる神経回路網を含むシステム全体の解析が必要と考えられた。そこで、細胞膜電位の光学測定法をモノアラガイ中樞神経系に適用することを試みた。膜電位の光学測定法は、電位感受性色素を用いることで神経組織の膜電位を二次元的に多点同時測定できるため、神経回路網の包括的な解析に有用である。しかしながら、膜電位の光学測定法は比較的新しい技術であり、測定方法の確立や光学シグナルの解析が容易でない。そこで第4章では、神経回路が良く調べられており比較的光学測定の容易なラットの海馬スライスにおいて膜電位の光学測定を行ない、その光学シグナルの性質を薬理的に調べた。その結果、得られた光学シグナルを、シナプス前細胞、シナプス後細胞、およびグリア細胞のそれぞれの脱分極応答として分離することに成功し、さらにグリア細胞の脱分極応答の解析から、グルタミン酸のシナプス間隙からの除去にグリア細胞のトランスポーターが主要な役割をになっていることを、直接的に示すことに成功した。

次に、海馬スライスの膜電位光学測定から得られた知見をもとに、モノアラガイ中樞神経系における膜電位応答の二次元的解析を光学測定により行なった。第5章では、味覚入力に対する中樞神経系での応答を調べるため、味覚入力があるMedian Lip Nerve (MLN)を電気刺激した時の脳神経節での膜電位応答を光学測定した。その結果、脳神経節およびMLNにおいて活動電位の二次元的伝播とそれに引き続く比較的ゆっくりとした脱分極応答が観察された。この脱分極応答は、薬理的解析などから、カルシウム流入によるグリア細胞の脱分極であることが明らかとなり、モノアラガイの味覚情報処理過程においてグリア細胞が大きな役割を果たしていることが示唆された。

第6章では、味覚嫌悪学習による神経応答の変化を二次元的に調べるため、学習個体においてMLNを電気刺激したときの口球神経節での膜電位応答を光学測定した。その結果、口球神経節の複数領域において活動電位に対応するスパイク応答が観察されたが、その中でN1M細胞を含む領域での活動電位の頻度が、コントロール個体に比べて有意に減少していることが見出された。このことは、第3章で述べたN1M細胞でのIPSPの増大によって実際に咀嚼のCPGの応答が抑制されていることを示し、味覚嫌悪学習のニューロモジュレーションモデルが強く裏付けられた。

以上の研究結果は、軟体動物腹足類のみならず多くの動物における学習機構のモデルとして重要な役割を果たし、その神経メカニズムの解明に大きく貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主査 教授 浦野 明 央
副査 教授 小池 達 郎
副査 教授 高畑 雅 一
副査 助教授 伊藤 悦 朗

学位論文題名

Neuroethological Analyses of Associative Learning in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイにおける連合学習の神経行動学的解析)

動物の学習およびその記憶の保持に関わる神経メカニズムの研究は、現在の神経生物学において最も関心の高い分野の一つであり、学習能力の高い脊椎動物を中心にさまざまな動物を用いて進められている。しかしながら、脊椎動物の中樞神経系は膨大な数の神経細胞から成る非常に複雑なシステムであるため、「学習による行動の変化—神経回路の変化—シナプス伝達効率の変化」といった階層的つながりを追うことが難しく、その結果、各階層に限定された研究のみが行なわれている。一方、カタツムリなどの軟体動物腹足類は、非常に大きな神経細胞を含む単純な神経系をもつにもかかわらず、連合学習などの比較的高度な学習をすることが知られている。よって、上記の階層性に沿った解析が可能であり、学習行動の基礎となる神経機構を直接的に見出すことができると考えられる。本論文は、軟体動物腹足類のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を用いて、連合学習の神経メカニズムを解明することを目的とした。

第1章では、始めにモノアラガイにおいて物理的および化学的刺激に対する応答を解析し、学習実験に用いる嗜好性、中性、および忌避性の各刺激を選択した。次にそれらの刺激を用いて、嗜好性および忌避性の連合学習（古典的条件づけ）がモノアラガイにおいて成立することを示した。そしてそれらの行動学的解析から、嗜好性学習と忌避性学習の行動学的性質を明らかにした。また、これらの行動実験の結果をもとに、嗜好性および忌避性学習のためのニューロモジュレーションモデルを考え、それらの学習の神経機構の作業仮説を提出した。

第2章では、第1章の古典的条件づけより高次の連合学習である感性予備条件づけがモノアラガイにおいて成立することを示した。

第3章では、第1章で示した学習のうち忌避性学習の一種である味覚嫌悪学習に注目し、そ

のニューロモジュレーションモデルの妥当性を検証するため、電気生理学実験による解析を行なった。その結果、味覚嫌悪学習の成立に伴い、咀嚼応答を司るCentral Pattern Generator (CPG)の介在神経細胞において、CPG調節神経細胞からの抑制性入力が増強していることが見出された。これにより、ニューロモジュレーションモデルの妥当性が部分的に裏付けられた。

上記の抑制性入力の増強は、味覚嫌悪学習の素過程の一つであることが示唆された。しかし、学習機構のより詳細な解明のためには、学習に関わる神経回路網を含むシステム全体の解析が必要と考えられた。そこで、神経組織の膜電位を二次元的に多点同時測定できる膜電位光学測定法をモノアラガイ中枢神経系に適用することを試みた。しかしながら、膜電位光学測定法は比較的新しい技術であり、測定方法の確立や光学シグナルの解析が容易でない。そこで第4章では、神経回路が良く調べられており比較的光学測定の容易なラットの海馬スライスにおいて膜電位光学測定を行ない、その光学シグナルの性質を薬理学的に調べた。その結果、グリア細胞の脱分極応答が光学的に検出され、その解析から、グルタミン酸のシナプス間隙からの除去にグリア細胞のトランスポーターが主要な役割を担っていることを、はじめて直接的に示すことに成功した。

次に、海馬スライスの膜電位光学測定から得られた知見をもとに、モノアラガイ中枢神経系における膜電位応答の二次元的解析を光学測定により行なった。第5章では、味覚入力に対する中枢神経系での応答を調べるため、味覚入力があるMedian Lip Nerve (MLN)を電気刺激した時の脳神経節での膜電位応答を光学測定した。その結果、脳神経節およびMLNにおいて活動電位に引き続くグリア細胞の脱分極応答が観察され、モノアラガイの味覚情報処理過程においてグリア細胞が大きな役割を果たしていることが示唆された。

第6章では、味覚嫌悪学習による神経応答の変化を二次元的に調べるため、学習個体においてMLNを電気刺激したときの口球神経節での膜電位応答を光学測定した。その結果、口球神経節の複数領域において活動電位が観察されたが、その中でCPG介在神経細胞を含む領域での活動電位の頻度が、コントロール個体に比べて有意に減少していることが見出された。このことは、第3章で述べた抑制性入力の増強によって実際に咀嚼のCPGの応答が抑制されていることを示し、味覚嫌悪学習のニューロモジュレーションモデルが強く裏付けられた。

これを要するに、著者は、軟体動物腹足類において連合学習の神経機構についての新知見を得たものであり、これらの結果は、軟体動物腹足類のみならず多くの動物における学習機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。