

学位論文題名

Histological and Molecular Biological Analyses
of Neural Mechanism for Conditioned Taste Aversion
in the Pond Snail *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習に関わる
神経メカニズムの組織学および分子生物学的解析)

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、脊椎動物・無脊椎動物を問わず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—遺伝子発現の変化」といった階層的つながりに沿って解析することが難しく、その結果、各階層に限定された研究または階層性を無視した研究が行なわれている。一方、カタツムリなどの軟体動物腹足類は、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習得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1つである味覚嫌悪学習の神経メカニズムを組織学および分子生物学的手法により研究した。

第1章では、始めにモノアラガイの異なる発生段階における学習行動の変化に着目して、行動学的な解析を行った。すでにモノアラガイの成体では連合学習(古典的条件づけ)の一つである味覚嫌悪学習が成立することがわかっている。味覚嫌悪学習とは、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、モノアラガイは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。まず、Meshcheryakovの定義に基づいてさまざまな発生段階のモノアラガイを用いて、学習実験に用いる化学的刺激に対する応答から学習条件を設定した。刺激の強度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設定した。その結果、味覚嫌悪学習がモノアラガイの未成熟な個体においても成立することが示された。さらに、これらの行動学的解析から、モノアラガイの味覚嫌悪学習の学習・記憶過程には、少なくとも3つの段階が存在することが明らかになった。1) ショ糖溶液・塩化カリウム溶液に対して応答するが、それらを連合させた味覚嫌悪学習が成り立たない発生段階(St. 25, 胚期)。2) 味覚嫌悪学習は成立するがその記憶は長期間保持できない段階(St. 29, 孵化直前の胚期)。3) 味覚嫌悪学習が成立し、その記憶が長期間保持される段階(immature, 幼体期)。また、これらの行動実験の結果とともに各発生段階における自発性の運動能力を計測することで、

味覚嫌悪学習・記憶能力の発達がモノアラガイの生活環と相関性を持つことが示唆された。これらの結果から、モノアラガイの味覚嫌悪学習において、発生段階による学習・記憶能力の変化を明らかにすることができた。

第2章では、第1章において見出された味覚嫌悪学習能力の変化を、さらに解剖学的に検討した。まず第1章で用いた各発生段階のモノアラガイにおいて、味覚嫌悪学習に関与する神経節（脳神経節、口球神経節）の神経細胞数と体積の組織学的な解析を行った。アザン染色した薄切片を用いて観察を行った結果、まずモノアラガイの胚期から幼形期にかけて神経細胞数が著しく増大することがわかった。また長期記憶が保持できる幼体の段階に至ると、成体とほぼ同じ神経細胞数が揃っていることが明らかになった。一方これに対して、神経節の体積は体長に伴って成長を続けていた。このことから、味覚嫌悪学習が成り立つ発生段階までに、成体と変わらない神経細胞数がすでに存在し、発生に伴って細胞の成長が進むことが予想された。また、モノアラガイの味覚嫌悪学習に関わる神経回路の同定は電気生理学的にも進んでおり、味覚情報が脳神経節に存在するCerebral Giant Cell (CGC)で連合されていること、学習に伴ってCGCから介在神経細胞への入力が増加することが明らかにされている。そこでCGCの形態をLuccifer-yellow染色によって調べた結果、味覚嫌悪学習が成立する幼体期にはその形態がすでに成体と同じであることが明らかにされた。これらの結果から、味覚嫌悪学習の成立するためには十分な神経細胞数が必要であり、その長期記憶の形成には細胞の成長、特にkey neuronと考えられるCGCの成長が必要である可能性が示唆された。

第1章と第2章では、行動学的・組織学的な手法により発生によって変化する味覚嫌悪学習能力と中枢神経系との関係を示した。第3章では、学習機構のより詳細な解明のために、分子生物学的な手法を用いて味覚嫌悪学習に関わる神経メカニズムの解析を試みた。近年、学習・記憶形成機構のうち長期記憶を引き起こすメカニズムの中に、遺伝子発現による蛋白質合成という過程が必要であることが主張されている。そこで、味覚嫌悪学習の遺伝子レベルでの研究を始めるにあたり、重要な働きをすると予想される転写調節因子群cAMP responsive element結合蛋白質（CREB）に着目した。CREBには、PKAによってリン酸化されてホモダイマーを作り転写を促進するタイプCREB1と、CREB1とヘテロダイマーを作ることによって転写調節を抑制しているタイプCREB2がある。モノアラガイにおけるCREB1遺伝子およびCREB2遺伝子のクローニングを他動物の遺伝子配列を基に行い、cDNAシーケンスを決定した。またこれらから予想されるアミノ酸配列を他動物の配列と比較した結果、その機能部位において高い保存性が見られ、転写調節因子としての機能がよく保存されていることが示唆された。また、CREB1およびCREB2のmRNA発現状態を、northern blot法およびRT-PCR法を用いて解析した結果、中枢神経系において高い発現が見られた。さらに、中枢神経系における発現をin situハイブリダイゼーション法を用いて詳細に解析した結果、CREB1は味覚嫌悪学習のkey neuronであるCGCにおいて高く発現されていることがわかった。これに対してCREB2は多くの細胞で発現されており、その発現分布に差が見られた。これらの結果から、転写調節を促進するCREB1の割合が多いことから、CGCにおいては他の細胞と比べて転写調節が促進されやすい可能性が示唆された。また、CGCにcAMPを注入することで誘導される興奮性シナプス後電位の増強は、CREBの標的配列であるCRE配列の注入により抑制された。これは、学習・記憶の素過程であるシナプス伝達効率の増強に、CREB1が関与することを示唆するものである。

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

Histological and Molecular Biological Analyses of Neural Mechanism for Conditioned Taste Aversion in the Pond Snail *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習に関わる
神経メカニズムの組織学および分子生物学的解析)

動物の学習および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、脊椎動物・無脊椎動物を問わずさまざまな動物を用いて進められている。しかしながら、脊椎動物の中枢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—遺伝子発現の変化」といった階層的つながりに沿って解析することが難しく、各階層に限定された研究または階層性を無視した研究が行なわれている。一方、軟体動物腹足類は、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習得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1つである味覚嫌悪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、モノアラガイの異なる発生段階における学習行動の変化に着目して、行動学的な解析を行った。さまざまな発生段階のモノアラガイに学習実験を施した結果、味覚嫌悪学習がモノアラガイの未成熟な個体においても成立することが示された。さらに、この学習能力には発生に伴って3つの段階が存在することが明らかになった。1) 味覚刺激に対して反応するが味覚嫌悪学習が成り立たない発生段階。2) 味覚嫌悪学習は成立するがその記憶は長期間保持できない発生段階。3) 味覚嫌悪学習が成立し、その記憶が長期間保持できる発生段階。また、自発性の運動能力を計測することで、味覚嫌悪学習・

記憶能力の発達がモノアラガイの生活環と相関性を持つことが示唆された。これによりモノアラガイの味覚嫌悪学習において発生に伴う学習・記憶能力の変化を行動学的に明らかにすることができた。

第2章では、第1章において見出された発生段階における味覚嫌悪学習能力の変化をさらに解剖学的に検討した。まず第1章で用いた各発生段階のモノアラガイにおいて、味覚嫌悪学習に関与する神経節の細胞数と体積の組織学的な解析を行った。その結果、長期記憶が保持できる幼体の段階に至ると、成体とほぼ同じ神経細胞数が揃っていることが明らかになった。これに対して、神経節の体積は体長に伴って成長を続けていた。また、味覚嫌悪学習のkey neuronであるCerebral Giant Cell (CGC)の形態は、味覚嫌悪学習が成立する発生段階にはほぼ成体と同じであることが明らかにされた。これらの結果から、味覚嫌悪学習の成立には十分な神経細胞数が必要であり、その長期記憶の形成には細胞の成長、特にkey neuronの成長が必要である可能性が示唆された。

第3章では、学習・記憶形成機構のより詳細な解明のために、分子生物学的な手法を用いて味覚嫌悪学習に関わる神経メカニズムの解析を試みた。まず、長期記憶形成機構の中で重要な働きをすると予想されるcAMP responsive element結合蛋白質 (CREB) に着目した。転写調節因子群の1つであるCREBには、転写を促進するCREB1と、転写調節を抑制しているCREB2がある。最初に、モノアラガイにおけるCREB1およびCREB2のcDNA配列を決定し、予測されるアミノ酸配列を他動物の配列と比較した。その結果、それぞれの機能部位において高い保存性が見られ、転写調節因子としての機能が保存されていることが示唆された。また、複数の組織でのmRNA発現状態をノーザンブロット法およびRT-PCR法を用いて解析した結果、CREB1とCREB2のmRNAは共に中枢神経系で高い発現が見られた。さらに*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、これらの遺伝子の中枢神経系における発現を解析した結果、CGCにおいてCREB1mRNAが特に高く発現されていた。CREB2mRNAは多くの細胞で発現されており、その発現分布に差が見られたことから、CGCにおいては転写調節が他の細胞より促進されやすい可能性が示唆された。また、CREB1の標的配列であるCRE配列をCGCに注入すると、シナプス伝達効率の変化が起こった。このことから、味覚嫌悪学習のkey neuronではCREB1を含む転写調節機構が働いていることが示された。

これを要するに、著者は、軟体動物腹足類において味覚嫌悪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。