

学 位 論 文 題 名

Cellular 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  
神経メカニズムの細胞・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。動物の学習機構を正確に解明するには、動物が持つ独自の階層性、すなわち「学習行動」⇔「脳」⇔「神経回路」⇔「ニューロン」⇔「遺伝子発現」という一連の機構を正確に捉えたものでなければならない。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。

そこで本研究では、軟体動物腹足類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析した。特に階層性の「ニューロン」⇔「遺伝子発現」に的を絞り、免疫組織学化学的および分子生物学的手法により研究を行なった。

第 1 章・第 2 章では、モノアラガイ中枢神経系において、発生・成長に伴う神経伝達物質セロトニンの局在変化を免疫組織化学的に解析した。これまでの報告では、セロトニンはモノアラガイ中枢神経系に多量に含まれており、様々な生理現象の発現に重要な役割を担っていることが分かっている。そこで、特に重要な発生・成長段階 (St. 25, St. 29, 幼体) に着目し、Cerebral Giant Cell (CGC) において、発生・成長に伴うセロトニン様免疫反応の局在変化を観察した。セロトニン様免疫反応は、脳神経節ではニューロンの細胞体と神経繊維で、口球神経節では神経繊維においてのみ観察された。特に、味覚嫌悪学習が初めて可能になる発生段階 St. 29 において、セロトニン様免疫反応が学習の鍵を握る CGC で初めて観察された。さらに、CGC の形態を観察すると、幼体では CGC から伸びて口球神経節内に広がっている神経繊維が大変良く発達しており、成体とほぼ同じように広がっていた。脳神経節内のニューロンでセロトニン様免疫反応を示す他のニューロンについては、幼体において、これほどの神経繊維の発達は確認されなかったため、CGC が他のセロトニン作動性ニューロンに比べてより早く発達することが分かった。以上により、味覚嫌悪学習を初めて習得する発生段階と、学習の鍵を握る CGC がセロトニンを神経伝達物質として獲得する発生段階とが、強い正の相関関係にあることが示された。そして、CGC の発達は他のニューロンに比べて明らかに早く、幼体で既に成体と同じように神経繊維が広く分布して

いた。

第3章では、神経伝達物質 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) に着目し、モノアラガイ中枢神経系における局在を免疫組織化学的に解析した。GABA も前述のセロトニン同様、モノアラガイの咀嚼運動への関与が示唆されており、モノアラガイの開放血管系に GABA を注入することによって咀嚼運動が開始される、という報告がある。GABA の局在はこれまでモノアラガイの嗅覚受容器官では報告されているが、中枢神経系においては解析された例はない。そこで、モノアラガイの中枢神経系において、抗 GABA 免疫反応を観察したところ、全ての神経節において免疫陽性細胞を認めた。モノアラガイの近縁種 *Helisoma* の中枢神経系においては、GABA の免疫反応が解析されているため、*Helisoma* とモノアラガイとを比較した結果、モノアラガイの口球神経節でも *Helisoma* の咀嚼運動ニューロンと相同なニューロンで抗 GABA 免疫反応があることが分かった。この結果より、GABA もモノアラガイの咀嚼運動発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。同時に、発生・成長過程での GABA の発現時期の観察を行った。胚では抗 GABA 免疫反応は観察されず、孵化後に GABA が発現してくることが分かった。そして、ほとんどの神経節では抗 GABA 免疫反応を示すニューロンの数は増加したが、脳神経節ではその数が減少しているのが観察された。この結果より、モノアラガイの成長過程において、GABA が別の神経伝達物質に取って代わられると予想された。

第1章から第3章では、免疫組織化学手法により発生・成長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4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、遺伝子発現による新しいタンパク質合成という過程が必要であると主張されている。そこで、味覚嫌悪学習成立において重要な働きをすると予想される転写調節因子 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) に着目した。モノアラガイにおける C/EBP 遺伝子のクローニングを近縁種アメフラシの遺伝子配列を基に行い、その cDNA 配列を決定したところ、複式スプライシングにより、インサート部位を持つ C/EBP clone 1 と C/EBP clone 2 の2種類のアイソフォームがあることが明らかになった。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、DNA 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。次に、C/EBP の発現状態を、RT-PCR 法およびウェスタン・ブロッティング法を用いて解析した結果、中枢神経系においては C/EBP clone 1 が C/EBP clone 2 のそれよりも多量に存在していることが明らかにされた。更に、中枢神経系における C/EBP mRNA およびタンパク質の局在を、それぞれ *in situ* ハイブリダイゼーション法、および免疫組織化学的手法を用いて詳細に解析した。その結果、C/EBP mRNA およびタンパク質は特に B2 運動ニューロンに局在していることが分かった。B2 運動ニューロンは CGC の後シナプス・ニューロンであり、モノアラガイの消化運動を制御している。単一細胞定量リアルタイム PCR 法により、単一の B2 運動ニューロンにおける C/EBP clone 1 の mRNA 量は、味覚嫌悪学習に伴い有意に減少することが明らかになった。一方、ウェスタン・ブロッティング法により B2 運動ニューロンを含む口球神経節の C/EBP の翻訳レベルおよびリン酸化レベルは学習によって増加することが分かった。これらの結果は、学習に伴って、B2 運動ニューロンにおける C/EBP 遺伝子の転写活性は減少しているが、一方で、C/EBP タンパク質の翻訳活性およびリン酸化活性は増加することを示している。以上より、C/EBP の mRNA およびタンパク質のターンオーバーが味覚嫌悪学習の際に変化することが、味覚嫌悪学習の成立に重要な役目を果たしていると考えられた。

以上の研究結果は、モノアラガイの味覚嫌悪学習成立機構を細胞・分子レベルで解析したものであるが、明らかにされた神経メカニズムは、軟体動物のみならず多くの動物における学習機構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 助 教 授 伊 藤 悦 朗  
副 査 教 授 浦 野 明 央  
副 査 教 授 小 池 達 郎  
副 査 教 授 高 畑 雅 一

## 学 位 論 文 題 名

### Cellular 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  
神経メカニズムの細胞・分子生物学的解析)

動物の学習機構を正確に解明するには、動物が持つ階層性を正確に捉えたものでなければならない。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、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。そこで本研究では、軟体動物腹足類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細胞・分子レベルでの神経メカニズムを、特に免疫組織化学的および分子生物学的手法により解析した。

第1章・第2章では、モノアラガイ中枢神経系において、発生・成長に伴う神経伝達物質セロトニンの局在変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、味覚嫌悪学習が初めて可能になる発生段階 St. 29 において、セロトニン様免疫反応が学習の鍵を握る Cerebral Giant Cell (CGC) で初めて観察された。さらに、CGC の形態を観察すると、幼体では CGC から伸びて口球神経節内に広がっている神経繊維が大変良く発達しており、成体とほぼ同じように広がっていた。脳神経節内のニューロンでセロトニン様免疫反応を示す他のニューロンについては、幼体において、これほどの神経繊維の発達は確認されなかったため、CGC が他のセロトニン作動性ニューロンに比べて、より早く発達することが分かった。以上により、味覚嫌悪学習を初めて習得する発生段階と、学習の鍵を握る CGC がセロトニンを神経伝達物質として獲得する発生段階とが、強い正の相関関係にあることが示された。そして CGC の発

達は他のニューロンに比べて明らかに早く、幼体で既に成体と同じように神経繊維が広く分布していた。

第3章では、神経伝達物質 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) に着目し、モノアラガイ中枢神経系における局在を免疫組織化学的に解析した。モノアラガイの近縁種 *Helisoma* およびモノアラガイにおける抗 GABA 免疫反応を示したニューロンを比較した結果、モノアラガイの口球神経節でも *Helisoma* の咀嚼運動ニューロンと相同なニューロンで抗 GABA 免疫反応が観察され、GABA もモノアラガイの咀嚼運動発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。同時に、発生・成長過程での GABA の発現時期の観察を行った。胚期では抗 GABA 免疫反応は観察されず、孵化後に GABA が発現してくることが分かった。そして、脳神経節では抗 GABA 免疫反応を示すニューロンの数が減少しているのが観察されたため、モノアラガイの成長過程において、GABA が別の神経伝達物質に取って代わられると予想された。

第4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。味覚嫌悪学習において重要な働きをすると予想される転写調節因子 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) に着目し、クローニングに成功した。塩基配列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、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。*in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学的手法を行なった結果、C/EBP mRNA およびタンパク質は C/EBP mRNA およびタンパク質は、CGC の後シナプス・ニューロンである B2 運動ニューロンに特に局在していることが分かった。単一細胞定量リアルタイム PCR 法により、単一の B2 運動ニューロンにおける C/EBP clone 1 の mRNA 量は、味覚嫌悪学習に伴い有意に減少することが明らかになった。一方、ウェスタン・ブロッティング法により B2 運動ニューロンを含む口球神経節の C/EBP の翻訳レベルおよびリン酸化レベルは増加することがわかった。これらの結果は、学習に伴って B2 運動ニューロンにおける C/EBP 遺伝子の転写活性は減少しているが、一方で、C/EBP タンパク質の翻訳活性およびリン酸化活性は増加することを示している。以上より、C/EBP の mRNA およびタンパク質のターンオーバーが味覚嫌悪学習の際に変化することが、味覚嫌悪学習の成立に重要な役目を果たしていると考えられた。

これを要するに、以上の一連の結果は、モノアラガイの味覚嫌悪学習成立機構を、特に階層性の細胞・分子レベルで解析したものであり、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。