

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570077

研究課題名（和文） 脳の機能的偏側性が生じるメカニズムの解明

研究課題名（英文） The analysis of laterality in the brain function

## 研究代表者

松尾 亮太 (RYOTA MATSUO)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：40334338

研究成果の概要（和文）：多くの動物の脳機能は左右で同じではなく、機能的分業や偏側性が認められる。軟体動物腹側類であるナメクジは、嗅覚忌避連合学習を獲得可能であり、この学習には脳の左右に一对存在する前脳葉と呼ばれる高次嗅覚中枢が必要である。そして、記憶形成時には左右いずれか片側の前脳葉しか使われていないことが先行研究により示唆されていた。そこで本研究では、片側前脳葉の破壊実験を行うことで、行動学的に（1）記憶形成時には片側の前脳葉のみが左右いずれか一方のみがランダムに使用されていること、（2）記憶が片側の前脳葉に貯蔵されていること、（3）記憶が左右の前脳葉間で転送されることはないこと、の3点を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Functional laterality of the brain is widely observed in the animal kingdom. The terrestrial mollusk *Limax* has an ability to acquire associative olfactory memory, and this ability is dependent on a part of the brain, procerebrum, that is equipped bilaterally in the brain. A previous report by other group suggested that only the unilateral procerebrum is used for the mnemonic function, but there was no evidence based on a behavioral study. By means of surgical brain ablation in combination with the behavioral study, we have demonstrated that (1) either right or left procerebrum is randomly used, (2) the memory is stored in a unilateral procerebrum, and (3) there is no memory transfer from one procerebrum to the other.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：神経行動、記憶・学習

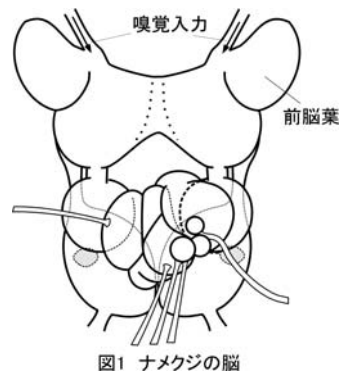
## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいては、言語機能や音楽情報処

理など、高次脳機能のうちのいくつかに関し、左右大脳半球のうちのどちらかがメインと

して用いられている。こういった脳機能の偏側性 (laterality) は、無脊椎動物でも知られており、ミツバチにおける匂い - 報酬連合学習では、記憶獲得時には右半分の脳だけが使われていることも知られている (Letzkus et al. 2006)。

ナメクジの嗅覚忌避学習においては、高次嗅覚中枢である前脳葉 (図 1) の存在が必須であり、両側の前脳葉が破壊されると記憶の成立や想起が不可能になる (Kasai et al. 2006)。一方、条件づけ直後に体



腔内に蛍光色素 (Lucifer Yellow) を投与されたナメクジでは、左右いずれか片方のみの前脳葉のニューロンに、学習特異的に色素が取り込まれることが報告されていた (Kimura et al. 1998; Ermentrout et al. 2001)。しかしこの現象は、学習時に左右いずれか片方の前脳葉しか使われていないということを直接示しているわけではなかった。

ところが申請者は、条件づけの翌日に左右いずれか片方の前脳葉を破壊すると、擬手術群と両側破壊群との間の中間的な学習成

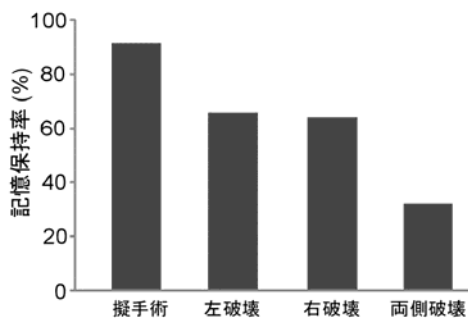


図2. 条件づけ翌日に、前脳葉を外科的に破壊し、その7日後に記憶保持テストを行った結果。片側前脳葉破壊群では、擬手術群と両側破壊群との間の中間的な成績を示した。

績を示すことを見出していた (図 2: 研究開始当時は未発表)。これは、学習に左右いずれか片方の前脳葉のみが用いられていることを支持するデータである。同時に、この申請者のデータと Kimura らの報告 (1998) は、ナメクジが左右前脳葉を、ほとんど偏りなくランダムに使用していることも示している。申請者が用いているナメクジは、十数世代にわたって閉鎖交配系で維持されてきたものであるため、遺伝的にはかなり均一であり、使用する前脳葉の左右偏側性が個体ごとに遺伝的、生得的に、しかも左右均等となるよう決まっているとは考えにくい、これを完全に否定するデータも無かった。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではナメクジ前脳葉における記憶学習機能の偏側性のメカニズムを明らかにすることを旨とし、以下の4つの実験を行うことを目的とした。

- (1) 前脳葉の使用の偏側性が、個体ごとに生得的に決定されたものであるのか否か、脳の外科的手術と行動実験を組み合わせることで、明らかにする。記憶機能に供される前脳葉の左右性が、触角からの嗅覚入力の有無によってどのように影響を受けるかを明らかにする。
- (2) 片方の前脳葉に貯蔵された記憶が、時間を経ると他方にも転送されるのか、脳の外科的手術と行動実験を組み合わせることで、明らかにする。
- (3) 左右前脳葉間で記憶情報、嗅覚情報を相互に伝えるニューロンおよび神経伝達物質を明らかにする。
- (4) 左右いずれの前脳葉を使うかを決定し

ている要因を、匂い入力の強度とタイミングに着目し、行動実験、および電気生理学的な *in vitro* 条件づけ系を利用して明らかにする。

### 3. 研究の方法

研究目的の (1)、(2) については、ナメクジの脳および触角への外科的手術と学習行動実験を組み合わせた実験を行った。研究目的の (3) については、これまで脳内における神経投射様式が知られていなかった複数の神経伝達物質に対する免疫組織染色を中心とした解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) : 嗅覚忌避連合学習記憶が、左右いずれか片側の前脳葉に貯蔵されるものであるとすれば、学習後に片側の前脳葉を切除された個体は、約 50% の確率で記憶を失うことが予想される。そこで、条件付けの翌日に左右いずれか片側の前脳葉を外科的に切除し、その 7 日後に記憶保持テストを行ったところ、片側切除群では両側切除群と非切除群（擬手術群）の間の中間程度の成績を示し、また左前脳葉切除群と右前脳葉切除群との間に成績の差は認められなかった（上記の図）。また、あらかじめ片側の前脳葉を切除し、その 7 日後に条件付けを行い、さらに翌日に記憶保持テストを行ったところ、この場合にもやはり片側切除群は両側切除群と非切除群の間の中間程度の成績を示した。従って、嗅覚忌避連合学習記憶はこれまで推定されていた通り、左右いずれか片側の前脳葉に貯蔵され、左右の偏りはほとんどないことが行動学的に示された。さらに、初めから片方の前脳葉しか存在しない場合でも、記憶機能は左右の前脳葉に均等に割り当てられることも示唆された。し

かしながら、片側前脳葉の破壊に加えて、同側あるいは対側の大小触角を同時に切断しておくこと、成績の低下が認められなかったことから、嗅覚入力、前脳葉に到達する前に左右間での何らかの相互作用をした後、左右いずれか片側の前脳葉へ記憶学習機能が振り分けられるという可能性が示唆された。

(2) : それでは、左右いずれか片側に貯蔵された記憶情報が、後に他方へと転送され、左右の前脳葉の間で共有されるようになるのであろうか？この可能性を確かめるため、左右の前脳葉が存在する状態で条件付けを行い、その後、十分時間が経過した後（7 日後）、左右いずれか片側の前脳葉を外科的に破壊することを行った。そして、さらにその 7 日後に記憶保持テストを行った。仮に、学習後の 7 日間に一方の前脳葉から他方へと記憶が転送され、両方の前脳葉の間で記憶情報が共有される状態になるのであれば、その時点で片側の前脳葉を切除されても記憶の想起は損なわれないであろうことが予想される。しかしながら結果は、左右いずれか片側の前脳葉切除群では、両側切除群と擬手術群との中間程度の成績を示し、予想されたような記憶の左右間転送の痕跡は認められなかった。

(3) 以上で見てきた通り、左右前脳葉の間での記憶情報の転送は存在しないものの、触角経由で入力してくる嗅覚情報の中で左右間相互作用が存在することが (1) の結果から予想される。この相互作用を担う神経連絡の実体を明らかにするため、大脳神経節の左右交連を通過する可能性のある神経伝達物質について、その投射様式と細胞体の位置などを解析した。調べた神経伝達物質は以下の通りである：1. GABA、2. NdwFamide、3. Fmrfamide、4. セロトニン、5. アセチルコ

リン、6. グルタミン酸。このうち、FMRFamide、セロトニン、GABA、グルタミン酸については大脳神経節における明らかな左右連絡が認められた。これらの神経伝達物質が左右大脳神経節間での情報連絡を担っている可能性がある。また、アセチルコリンについては、アセチルコリンそのものを組織化学的に可視化することが困難であるため、その合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼを可視化すべく、リコンビナントタンパクに対するポリクローナル抗体を作成した。現在も引き続きこの抗体のクオリティーチェックを進めている。

(4) 最後に、左右いずれの前脳葉を使用するかを決めている要因についてであるが、これについては未着手の状態である。左右の触角からの嗅覚入力がどのように競合し、どういった要因によって左右前脳葉間の優位性が決定されるのか、といったことに関しては、まだ推測の域を出ない。例えば、大脳神経節にわずかでも先に入力した側の前脳葉が記憶機能に供される、といった可能性などである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Ito E, Matsuo R, and Okada R.  
Involvement of nitric oxide in memory formation in microbrains.  
*Neurosci Lett* 541, 1-3 (2013).
- 2) Yamagishi M, Ito E, and Matsuo R.  
Whole genome amplification in large neurons of the terrestrial slug *Limax*.  
*J Neurochem* 122, 727-737 (2012).
- 3) Yamagishi M, Ito E, and Matsuo R.

DNA endoreplication in the brain neurons during body growth of an adult slug.

*J Neurosci* 31, 5596-5604 (2011).

- 4) Matsuo R, Kobayashi S, Morishita F, and Ito E.

Expression of Asn-d-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> in the brain of the terrestrial slug *Limax valentianus*.

*Comp Biochem Physiol B* 160, 89-93 (2011).

- 5) Matsuo R, Kobayashi S, Tanaka Y, and Ito E.

Effects of tentacle amputation and regeneration on the morphology and activity of the olfactory center of the terrestrial slug *Limax valentianus*.

*J Exp Biol* 213, 3144-3149 (2010).

- 6) Matsuo R, Kawaguchi E, Yamagishi M, and Ito E.

Unilateral memory storage in the terrestrial slug *Limax*.

*Neurobiol Learn Mem* 93, 337-342 (2010).

- 7) Matsuo R, Kobayashi S, Murakami J, and Ito E.

Spontaneous recovery of the injured higher olfactory center in the terrestrial slug *Limax*.

*PLoS One* 5, e9054 (2010).

- 8) Kobayashi S, Hattori M, Elekes K, Ito E, and Matsuo R.

FMRFamide regulates oscillatory activity of the olfactory center in the slug.

*Eur J Neurosci* 32, 1180-1192 (2010).

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Matsuo R. "DNA endoreplication in the brain neurons during the body growth of an adult slug." 8<sup>th</sup> International

- Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2010年6月2日(名古屋)
- 2) Matsuo R. “DNA endoreplication in the brain neurons during the body growth of an adult slug.” 12th Symposium on Invertebrate Neurobiology, 2010年9月(ティハニー(ハンガリー))
  - 3) 松尾亮太、山岸美貴、伊藤悦朗 「ナメクジの体重増加に伴う脳の巨大化は、ニューロンにおけるDNA合成を伴う」第33回日本分子生物学会、2010年12月(神戸)
  - 4) 松尾亮太、山岸美貴、伊藤悦朗 「成体ナメクジにおける肥満はニューロンにおけるDNA増幅を伴う」第82回日本動物学学会、2011年9月22日(旭川)
  - 5) Matsuo R. “Neuronal DNA amplification is polyploidization brought about by target innervation.” 2<sup>nd</sup> Molluscan Neuroscience Meeting 2012年5月17日(ジュピター(アメリカ))
  - 6) Matsuo R. “Neurobiology of the land slug *Limax*.” 第34回日本比較生理生化学会 2012年7月6日(葉山)
  - 7) 松尾亮太 「ナメクジにおける『脳まるごと移植』技術」第83回日本動物学学会、2012年9月13日(大阪)
  - 8) 松尾亮太、山岸美貴、脇谷恭子、田中陽子. 「ニューロンの核ゲノム増幅は臓器への神経投射を介して起こる倍数化である」第35回日本神経科学会 2012年9月19日(福岡)

[図書] (計2件)

- 1) 松尾亮太、他42名、共立出版、「研究者が教える動物飼育」2012年、pp 39-54.
- 2) Matsuo R.、他25名、Nova Publishers、“Snails: Biology, Ecology and Conservation”、2012年、pp 151-162.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：

種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
 ホームページ等

<http://researchmap.jp/matsuo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 亮太 (MATSUO RYOTA)  
 徳島文理大学・香川薬学部・准教授  
 研究者番号：40334338

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：