

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 16 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291074

研究課題名(和文) 脳内インスリンによる学習記憶機構の調節

研究課題名(英文) Control of learning and memory by insulin in the molluscan brain

研究代表者

伊藤 悦朗 (Ito, Etsuro)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：80203131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：モノアラガイは味覚嫌悪学習を施すとインスリン様ペプチド遺伝子の転写発現が亢進していることが、われわれの先行研究からすでにわかっていた。そこで、単離したモノアラガイの脳に、インスリン様ペプチドを投与したところ、味覚嫌悪学習の基盤となる神経シナプスにおいて「長期増強」が観察された。さらにはモノアラガイ個体においても、脳内インスリン濃度が学習成績を決めていることが明らかとなった。そして最終的には、栄養状態と学習成績との関係を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The pond snail *Lymnaea stagnalis* is capable of learning taste aversion and consolidating this learning into long-term memory (LTM) that is called conditioned taste aversion (CTA). Previous studies showed that some molluscan insulin-related peptides (MIPs) were up-regulated in snails exhibiting CTA-LTM. In the present study, when we applied partially purified MIPs to the isolated CNS, we observed a long-term change in synaptic efficacy of the synaptic connection between the CTA-related neurons. Injection of insulin or insulin receptor antibody into the snail also suggested that MIPs trigger CTA-LTM. Finally, we could clarify the relation between the CTA grades and the nutritional states, such as food satiation or food starvation.

研究分野：神経生物学

キーワード：モノアラガイ 味覚嫌悪学習 インスリン 飢餓 満腹 長期記憶

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者らは、脳の構造が簡単でニューロンの数が少なく、しかし、脳の高次機能の研究に最適な動物である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、その脳高次機能の一つである「学習記憶機構」について研究を続けてきた。このモノアラガイに味覚嫌悪学習を施すと、もともと嗜好性のあったショ糖を食べることができなくなる。その脳内機構を調べて行くにあたり、われわれは 2006 年にモノアラガイの脳の cDNA ライブラリーを用いて、モノアラガイ専用の「マイクロチップ」を作製し、学習習得後、長期記憶に移行した状態でどの遺伝子が脳内で発現亢進 (または発現抑制) しているのかを調べた。その結果、味覚嫌悪学習を習得した個体では、インスリン様ペプチド (molluscan insulin-related peptide: MIP) の遺伝子が発現亢進していることがわかった。なお、このインスリン様ペプチドは、ほ乳類のインスリンと相同な働きをすることもわかった。

2. 研究の目的

本研究では、モノアラガイ脳内のインスリン様ペプチドの濃度をコントロールすることによって、インスリン様ペプチド濃度と学習成績 (すなわち行動変容) との関係について調べることを目的とした。そのためには、インスリン様ペプチドを精製すること、そしてその脳内濃度をコントロールする方法を、まずは確立する必要があった。一方で、インスリン濃度を変化させることは、すなわち脳内のグルコース濃度を変化させることでもある。したがって、脳内のグルコース濃度も厳密に測定し、合わせてこの濃度と学習成績についても検討することにした。

一方である見方をすれば、脳内のグルコースやインスリンの濃度は、その個体の栄養状態に依存する。したがって、われわれは最終的には、栄養状態と学習成績との関係を明らかにしたかった。重要な点であるが、軟体動物腹足類は開放血管系であり、体内濃度と脳内濃度は同じだと解釈できる。

3. 研究の方法

(1) インスリン様ペプチドの精製

モノアラガイのインスリン様ペプチド (MIP) は世界で最初に Amsterdam 自由大学で発見され、当時は無脊椎動物でもついにインスリンが見つかった、と世界的な話題となった。このインスリン様ペプチドは、ほ乳類のインスリンと同様に、体内のグルコース濃度を下げたり、神経系の成長に効果があることも明らかとなった。われわれは独自に、インスリン様ペプチドを精製する必要があった。そこでまずは、モノアラガイからインスリン様ペプチドを含む脳部位を単離し、インスリン様ペプチドの精製を行った。

(2) 単離脳での電気生理学実験

モノアラガイのインスリン様ペプチドが精製されたら、それを単離脳標本に投与して、長期増強が惹起されるか否かを確認した。とくに脳内の生理的濃度を重視し、長期増強を惹起する閾値としての濃度を決定した。コントロール実験としては、ペプチドを酵素消化した溶液を用いた。また抗インスリン受容体抗体を、インスリン様ペプチドとともに投与した場合の効果についても調べた。

(3) モノアラガイ個体を用いた学習実験

市販のほ乳類のインスリンまたはインスリン様ペプチドを脳内投与して、行動に与える影響を調べた。インスリン注射によって、心拍数の変化や、呼吸や移動スピードの変化、さらには味覚嫌悪学習の条件刺激や無条件刺激を個体に与えた際の行動変化などを、詳細に観察・記録しておくことが重要であった。一方で、インスリン受容体のインスリン結合部位は、種を越えて保存性が高く、したがってほ乳類のインスリン受容体抗体がモノアラガイの受容体にも結合する可能性が高い。そこでこの受容体抗体の脳内投与による効果についても調べた。

(4) 満腹 / 飢餓などの栄養状態の違いによる学習成績の検討

われわれのこれまでの経験から、モノアラガイは行動実験の 1 日前に絶食させたほうが学習成績は良い。つまり満腹よりは少し空腹の方が良く学習する。また 5 日間連続で絶食させてしまうと、こちらも学習成績が落ちる。すなわち飢餓がひどいと学習しない。餌の量を栄養状態とすると、その栄養状態が脳内のグルコース濃度ひいてはインスリン様ペプチド濃度に影響を及ぼし、それが学習成績ならびに長期記憶の保持率に関与すると予想した。

4. 研究成果

(1) インスリン様ペプチドの精製

モノアラガイの脳において、インスリン様ペプチドは light green cell というニューロンに含まれていることが知られていたし、われわれ自身も in situ hybridization によってこれを確認することができた (文献 17)。そこで、light green cell ならびにその神経線維束を単離し、インスリン様ペプチドの精製に挑戦し、結果、部分的な精製に成功した (文献 17)。

(2) 単離脳におけるインスリン様ペプチドの影響

われわれはモノアラガイの単離脳を用いて、それに市販のウシのインスリンならびに部分精製したインスリン様ペプチドを投与し、味覚嫌悪学習の基盤となる神経シナプスに着目した電気生理学実験を行った。結果、どちらの場合にもこのシナプスにおいて「長

期増強 (long-term potentiation : LTP)」が観察された (文献 17)。長期増強は、特定のシナプスで伝達効率が上昇している現象であり、一般的には学習記憶機構の脳内の素過程であると考えられている。なお、インスリン様ペプチドの受容体は、今回着目したシナプスの後シナプス細胞を含むモノアラガイの脳内に幅広く (ubiquitous に) 発現していることも、in situ hybridization 法によって確認できた (文献 17)。なお付け加えておくが、このシナプスの神経伝達物質はセロトニンである。

さて、そのシナプスにおいて、インスリン様ペプチドがシナプス前細胞に効いているのか、後細胞に効いているのかを、paired pulse ratio 解析によって調べた。われわれの結果では、インスリン様ペプチドが効いているのはシナプス後細胞の可能性が高いことが示唆された (文献 15)。

(3) モノアラガイ個体の味覚嫌悪学習におけるインスリン様ペプチドの影響

単離脳でのシナプスの長期増強に対するインスリン様ペプチドの効果が明らかとなったので、実際のモノアラガイ個体でのインスリン様ペプチドの効果を調べてみた。通常であれば阻害剤を使用するところであるが、インスリン受容体はチロシンキナーゼ共役型受容体であるため、特異的な阻害剤を見つけられなかった。そこでインスリン受容体のインスリン結合部位が種を越えて普遍的であることに着目して、ヒトのインスリン受容体のインスリン結合部位を認識する抗体を、阻害剤代わりに用いることにした。その結果、実に興味深いことに、抗インスリン受容体抗体を注入した個体で味覚嫌悪学習のトレーニングを施すと、「学習は成立する」ものの、それが「長期記憶へと固定化されない」ことが明らかとなった (文献 17)。すなわち、シナプスレベルでも個体行動レベルでも、インスリン様ペプチドが味覚嫌悪学習に関与していることが明確になった。

(4) 味覚嫌悪学習後のインスリン受容体量的変化

インスリン様ペプチドが味覚嫌悪学習で使われており、かつシナプス後細胞で働いているとして、味覚嫌悪学習の最中にインスリン受容体量が変化しているか否かを調べる必要があった。結果、インスリン受容体量は変化していないことがわかった (文献 14)。繰り返しになるが、このシナプスの神経伝達物質はセロトニンである。セロトニン受容体があるシナプス後細胞にインスリン受容体も同時に存在し、かつ、インスリン受容体量が変わらないのであるから、一つの可能性としては、味覚嫌悪学習の際にインスリン様ペプチドの量が増えて、シナプス後細胞の応答性を上げているのではないかと予想された。

(5) 味覚嫌悪学習を支配しているのはインスリン様ペプチドか、またはインスリンによるグルコース濃度の変化か

先述したとおり、モノアラガイのインスリン様ペプチドは、ほ乳類のものと同じようにグルコース濃度を下げる。したがって、インスリン様ペプチドが味覚嫌悪学習に深く関与しているとしても、そのものが関与しているのか、または結果としてグルコース濃度が下がることが関与しているのかを調べる必要があった。われわれが得た最初の結果は、グルコース濃度は味覚嫌悪学習にはあまり直接的に関与しないというものであった (文献 10)。この時点で、インスリン様ペプチドの直接的な効果に着目すべきであることが決まった。

一方で、グルコース濃度変化について、モノアラガイの移動行動に関わるニューロンへの影響を調べたところ、これは明らかに影響を及ぼすことがわかった (文献 4, 5)。味覚嫌悪学習とは直接関係しないが、新たな知見として興味深い結果であった。

(6) 満腹 / 飢餓など栄養状態の違いによる学習成績の違い

われわれはこれまで経験的に、1日の軽い絶食であれば味覚嫌悪学習が成立し良い学習成績を残し、5日の長いシビアな絶食のときは、学習成績が悪いことを知っていた。それ以外にも、最近、心臓の心拍数を計測すると、満腹状態のほうが飢餓状態よりも心拍数が高いこともわかった (文献 7)。ちなみにこの心拍数は、理由は不明であるが、セロトニン投与によって変化することも示された。すなわち、セロトニンは飢餓状態から満腹状態に、食欲を変化させている可能性も示唆された。

このように、飢餓状態と満腹状態ではさまざまな変化が起こるわけであるが、味覚嫌悪学習の成績が極端な飢餓状態で悪いとして、それをインスリン様ペプチドが成績を改善するのが次のポイントとなった。予想通り、5日間の長いシビアな飢餓状態において、インスリンを注入すると、学習成績の向上が認められた (文献 8)。これはモノアラガイにとって何を意味するのであろうか？モノアラガイにとっては次のような解釈が成り立つと考えられる。シビアな飢餓状態におかれたモノアラガイは、学習成績が悪いが、実はそれは見せ掛けだけであって、学習そのものは成立している。言い換えると、腹が空きすぎて、学習は獲得しているものの、「背に腹は代えられぬ」状況で、テスト時に咀嚼運動をしてしまう。こういう考え方がアイデアとして出てきた。そこで、各種の実験を行ったところ、確かにこのように「背に腹は代えられぬ」は成立していることが明らかとなり、かつ、その隠れた記憶を蘇らせるには、想起させる寸前に、同じような飢餓状態に再度モノアラガイをおく必要があることも示された

(文献3)

(7) その他

味覚嫌悪学習に關与する特定のシナプスは、細胞内の cAMP 濃度変化によって、セロトニンの放出量を変化させていることもわかり始めた(文献11)。また、味覚嫌悪学習の無条件刺激が、刺激の強さを x 軸に、学習成績を y 軸にとった時、逆 U 字型の Yerkes-Dodson 法則に従うことも明らかとなった(文献6)。そして、モノアラガイの自動学習装置の開発にも従事することができた(文献1)。最後に、本科研費の期間中にモノアラガイの学習・記憶について、2 編の review を書くことが許されたことは望外の喜びであった(文献2, 16)。本科研費に採択していただいたことにお礼を述べたい。

<引用文献>

引用文献の番号は下記の発表論文の番号に対応している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

(1) S.Takigami, H.Sunada, K.Lukowiak, E.Ito and M.Sakakibara: An automated learning apparatus for classical conditioning of *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci. Meth.*, 259: 115-121(2016), doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.10.008 (査読有)

(2) S.Kojima, H.Sunada, K.Mita, M.Sakakibara, K.Lukowiak, E.Ito: Function of insulin in snail brain in associative learning. *J. Comp. Physiol. A.*, 201: 969-981 (2015), doi: 10.1007/s00359-015-1032-5 (査読有)

(3) E.Ito, M.Yamagishi, D.Hatakeyama, T.Watanabe, Y.Fujito, V.Dyakonova and K.Lukowiak: Memory block: A consequence of conflict resolution. *J. Exp. Biol.*, 218: 1699-1704 (2015), doi: 10.1242/jeb.120329 (査読有)

(4) V. E. Dyakonova, L. Hernádi, E.Ito, T.L.Dyakonova, I.A.Chistopolsky, I.S.Zakharov and D.A.Sakharov: The activity of isolated neurons and the modulatory state of an isolated nervous system represent a recent behavioural state. *J. Exp. Biol.*, 218: 1151-1158 (2015), doi: 10.1242/jeb.111930(査読有)

(5) V. Dyakonova, L. Hernádi, E.Ito, T.Dyakonova, I.Zakharov and D.Sakharov: The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose. *BIOPHYSICS*, 11: 55-60 (2015), doi: 10.2142/biophysics.11.55 (査読有)

(6) E.Ito, M.Yamagishi, S.Takigami, M.Sakakibara, Y.Fujito and K.Lukowiak: The Yerkes-Dodson law and appropriate stimuli for conditioned taste aversion in

Lymnaea. *J. Exp. Biol.*, 218: 336-339 (2015), doi: 10.1242/jeb.113266 (査読有)

(7) M.Yamagishi, T.Watanabe, D.Hatakeyama and E.Ito: Effects of serotonin on the heartbeat of pond snails in a hunger state. *BIOPHYSICS*, 11: 1-5 (2015), doi: 10.2142/biophysics.11.1 (査読有)

(8) K.Mita, M.Yamagishi, Y.Fujito, K.Lukowiak and E.Ito: An increase in insulin is important for the acquisition conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 116: 132-138 (2014), doi: 10.1016/j.nlm.2014.10.006 (査読有)

(9) R.Matsuo, S.Kobayashi, K.Wakiya, M.Yamagishi, M.Fukuoka and E.Ito: The cholinergic system in the olfactory center of the terrestrial slug *Limax*. *J. Comp. Neurol.*, 522: 2951-2966 (2014), doi: 10.1002/cne.23559 (査読有)

(10) K.Mita, A.Okuta, R.Okada, D.Hatakeyama, E.Otsuka, M.Yamagishi, M.Morikawa, Y.Naganuma, Y.Fujito, V.Dyakonova, K.Lukowiak and E.Ito: What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion? *Neurobiol. Learn. Mem.*, 107: 1-12 (2014), doi: 10.1016/j.nlm.2013.10.013 (査読有)

(11) E.Otsuka, M.Matsunaga, R.Okada, M.Yamagishi, A.Okuta, K.Lukowiak and E.Ito: Increase in cyclic AMP concentration in a cerebral giant interneuron mimics part of a memory trace for conditioned taste aversion of the pond snail. *BIOPHYSICS*, 9: 161-166 (2013), doi: 10.2142/biophysics.9.161 (査読有)

(12) R.Matsuo, M.Yamagishi, K.Wakiya, Y.Tanaka and E.Ito: Target innervation is necessary for neuronal polyploidization in the terrestrial slug *Limax*. *Dev. Neurobiol.*, 73: 609-620 (2013), doi: 10.1002/dneu (査読有)

(13) E.Ito, R.Matsuo, R.Okada: Involvement of nitric oxide in memory formation in microbrains. *Neurosci. Lett.*, 541: 1-3 (2013), doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.021 (査読有)

(14) D.Hatakeyama, A.Okuta, E.Otsuka, K.Lukowiak and E.Ito: Consolidation of long-term memory by insulin in *Lymnaea* is not brought about by changing the number of insulin receptors. *Commun. Integr. Biol.*, 6: e23955 (2013), doi: 10.4161/cib.23955 (査読有)

(15) J.Murakami, R.Okada, Y.Fujito, M.Sakakibara, K.Lukowiak and E.Ito: Paired pulse ratio analysis of insulin-induced synaptic plasticity in

the snail brain. *J. Exp. Biol.*, 216: 1771-1773 (2013), doi: 10.1242/jeb.083469 (査読有)

(16) E.Ito, S.Kojima, K.Lukowiak and M.Sakakibara: From likes to dislikes: conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Can. J. Zool.*, 91: 405-412 (2013), doi: 10.1139/cjz-2012-0292 (査読有)

(17) J.Murakami, R.Okada, H.Sadamoto, S.Kobayashi, K.Mita, Y.Sakamoto, M.Yamagishi, D.Hatakeyama, E.Otsuka, A.Okuta, H.Sunada, S.Takigami, M.Sakakibara, Y.Fujito, M.Awaji, S.Moriyama, K.Lukowiak and E.Ito: Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.*, 33: 371-383 (2013), doi: 10.1523/JNEUROSCI.0679-12.2013 (査読有)

(18) K.Elekes, I.Battonyai, S.Kobayashi and E.Ito: Organization of the procererebrum in terrestrial pulmonates (*Helix*, *Limax*) reconsidered: Cell mass layer synaptology and its serotonergic input system. *Brain Struct. Funct.*, 218: 477-490 (2013), doi:10.1007/s00429-012-0409-2 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 悦朗 (ITO, Etsuro)

徳島文理大学・香川薬学部・教授

研究者番号：80203131

(2) 研究分担者

松尾 亮太 (MATSUO, Ryota)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：40334338