

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440163

研究課題名(和文) 昆虫の寿命延長処理に伴う記憶障害の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of memory impairment related to life-span extending treatments in insect

研究代表者

松本 幸久 (MATSUMOTO, YUKIHISA)

東京医科歯科大学・教養部・助教

研究者番号：60451613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：代表者はコオロギの長期記憶形成能力が加齢に伴い低下することを報告している。本研究ではコオロギを使って、寿命延長処理が記憶能力に及ぼす影響を調べた。低温環境で飼育したコオロギでは長期記憶形成能を維持したまま寿命が延長した。交尾制限したコオロギでは寿命が延長したが成虫脱皮の早い段階から記憶形成能が低下した。抗酸化物質のメラトニンを長期投与したコオロギでは、寿命の延長なしで長期記憶形成能を長く維持できた。また加齢コオロギにメラトニンを単回投与すると長期記憶が形成され、メラトニンが長期記憶の形成過程に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that LTM formation ability of crickets decline along with aging. In the present study, I demonstrated how three types of candidate life-span extending treatments affect the actual life-span and ability of LTM formation in crickets. Rearing the crickets under a low-temperature environment lead to extension in life-span along with sustained LTM formation ability. Mating restriction also extended the life-span but with impairment in LTM formation ability much earlier than the control group. Chronic administration of melatonin did not significantly extend the life-span, but LTM formation ability was conserved longer. I also found that single-injection of melatonin recovered the LTM formation ability in aged crickets, indicating the participation of melatonin in LTM formation process.

研究分野：生物学

キーワード：加齢性記憶障害 嗅覚学習 長期記憶 一酸化窒素 メラトニン 昆虫

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い脳が老化するという現象(加齢性記憶障害)は、ヒトを含む哺乳類だけでなく脊椎動物でも知られている。一方で、制限食餌や低温度飼育など、環境要因の制御による寿命の延長効果も様々な動物で報告されている。しかし、それらの寿命延長処理をした動物において加齢性記憶障害の発症も同様に遅延するのかを調べた研究、すなわち処理後に時間を追って学習・記憶能力を詳しく調べた研究は極めて少ない。

代表者は、成虫脱皮して1週間後(1週齢)のフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*、以下コオロギ)が齧歯類に引けを取らない高い学習能力を持つことを明らかにしている。さらに行動薬理などにより、コオロギの匂い学習の記憶が短期記憶、長期記憶などに分けられること、長期記憶の形成には一酸化窒素(NO)-cGMPシグナル伝達系の働きが必要不可欠であることを示した。また代表者は、成虫脱皮3週齢の加齢コオロギでは、短期記憶が正常に作られるが長期記憶が全く作れなくなること、すなわち長期記憶のみに加齢性記憶障害がみられることを見つけた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コオロギを用いて、寿命延長処理が脳の機能にどのような影響を与えるのかを調べることである。具体的には、まず、低温度飼育、交尾制限、抗酸化物質摂取飼育などの環境要因の制御によりコオロギの寿命が延長するのかを調べる。さらに、それらのコオロギの記憶能力を調べ、体の老化と脳の老化の関係性を見出す。

3. 研究の方法

(1) 材料: 研究にはフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いた。水への欲求を高めさせるために、実験の前に2-3日絶水させた。

(2) 学習実験: 学習訓練では、匂い(ペーパーミント)の条件刺激(conditioned stimulus: CS)と水の無条件刺激(unconditioned stimulus: US)を対提示(CS-US)した。匂いの嗜好性テストを訓練前と訓練後に行い、その結果を比較して学習訓練の効果を評価した。成虫脱皮1週齢の若齢コオロギでは、訓練1日後の長期記憶の形成には4回の訓練(試行内間隔5分間)が必要である。

(3) 薬理: L-NAME(NO合成酵素阻害剤)、シクロヘキシミド(タンパク質合成阻害剤)、グルタチオン、アスコルビン酸、メラトニン、6-ヒドロキシメラトニン(6-HM)、N-アセチル-N-フォルミル-5-メトキシキヌラミン(AFMK)、ルジンドール(メラトニン受容体阻害剤)などを血中投与し、学習や長期記憶に与える影響について調べた。

(4) LC-MSによる定量解析: 低温麻酔したコオロギから脳を取り出した後、ホモジェナイ

ズ、遠心分離して試料を作成し、高速液体クロマトグラフ質量分析器(LC-MS)でメラトニン代謝産物などの量を測定した。

4. 研究成果

(1) 飼育環境の温度を変えた時の成虫脱皮後の寿命への影響を調べた。通常の飼育環境(27°C)での平均寿命は雄が13日、雌が14日であった。低温飼育環境(20°C)では雄が18日、雌が19日と有意に長くなり、高温飼育環境(33°C)では雄雌共に6日と有意に短くなった。飼育温度の脳機能への影響を調べたところ、通常飼育環境(27°C)では、15日齢までは4回訓練の1日後の長期記憶が形成されたのに対し、20日齢以降では長期記憶が形成されなかった。低温飼育環境(20°C)では、20日齢までは長期記憶が形成され、25日齢以降では長期記憶が形成されなかった。すなわち、いずれも平均寿命を超えてから長期記憶形成能が損失していた。

(2) 交尾制限と寿命の関係を調べるために、成虫脱皮後から飼育ケースに雄のみにして飼育し雌との接触を断たせたところ、平均寿命が23日に延長した。この雄のみ飼育コオロギでは10日齢で長期記憶のスコアが有意に低下し、15日齢以降では長期記憶が全く形成されなかった。すなわち平均寿命よりもはるか前に長期記憶能が損失していたといえる。大変興味深いことに、交尾制限して長期記憶形成能が損失した雄コオロギ(雄のみ飼育で25日齢)を一定時間(1時間以上)雌とペアにさせたところ、長期記憶形成能が回復した。性的な刺激が脳を活性化したのかもしれない。

(3) 抗酸化物質であるメラトニン(10^{-6}M)を飲料水に混ぜて飼育したところ、成虫脱皮後の平均寿命(14日)は蒸留水飼育の対照群の平均寿命(14日)と有意な差がなかった。ただし対照群では20日齢で長期記憶が全く形成されなかったのに対し、メラトニン水飼育群では20日齢で長期記憶が形成された。すなわちメラトニンの長期投与で加齢性記憶障害が予防できたといえる。

(4) 本来は長期記憶が全く形成できない20日齢の加齢コオロギに対して、頭部にメラトニンを単回投与して4回訓練を行ったところ、訓練1日後の長期記憶が形成できた。すなわちメラトニンの単回投与で加齢性記憶障害を回復できたといえる。一方、他の抗酸化物質であるグルタチオンやアスコルビン酸の単回投与では加齢性記憶障害の回復効果がみられなかったことから、メラトニンは抗酸化作用とは別の機構で加齢性記憶障害を改善していると考えられた。

(5) メラトニンは長期記憶の形成機構に直接関与しているのではと考え、成虫脱皮1週齢の若齢コオロギを使って、長期記憶形成に対するメラトニンの効果を調べた。若齢コオロギにおいて1回の訓練では長期記憶が形成されないが、訓練前にメラトニンを投与すると訓練1日後の記憶が形成された。この記憶

はシクロヘキシミド（タンパク質合成阻害剤）をメラトニンと共投与することで完全に消失したため、タンパク質合成依存の長期記憶といえる。一方、グルタミン酸やアスコルビン酸の単回投与では長期記憶の誘導効果がみられなかったことから、メラトニンは抗酸化作用を介さず長期記憶の形成に関わることが示唆された。

(6) コオロギでは長期記憶の形成に一酸化窒素 (NO) の働きが必要不可欠であることが分かっている。長期記憶の形成過程におけるメラトニンと NO の関係を調べるために、1 回訓練の前に L-NAME (NO 合成酵素阻害剤) とメラトニンの共投与を行ったところ、長期記憶が形成できた。すなわちメラトニンは NO シグナル伝達系の下流で働いていることが示唆された。

(7) 齧歯類では、メラトニンは肝臓で 6-HM に代謝され、脳で AFMK に代謝されることが知られている。メラトニン代謝産物にも長期記憶誘導効果があるかをコオロギで調べた結果、AFMK には誘導効果があったが 6-HM には効果がなかった。またコオロギの脳でもメラトニンから AFMK の代謝経路があるのか LC-MS を使って調べたところ、メラトニン投与後のコオロギの脳から AFMK が検出された。対照群の生理食塩水投与群では AFMK が検出されなかったことから、コオロギの脳にも AFMK への代謝経路があるといえる。

(8) メラトニン受容体阻害剤のルジンドールを投与した後に 4 回訓練を行ったところ、長期記憶が全く形成されなかった。メラトニンは受容体を介して長期記憶を形成することが示唆された。

本研究で得られた知見は、寿命を短縮させずに加齢性記憶障害を治す新薬の開発にも繋がると期待できる。

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 Y. Matsumoto, C. S. Matsumoto, R. Wakuda, S. Ichihara and M. Mizunami (2015) Roles of octopamine and dopamine in appetitive and aversive memory acquisition studied in olfactory conditioning of maxillary palpi extension response in crickets. *Front Behav Neurosci* 9: 230. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00230. 査読有
- ② K. Terao, Y. Matsumoto and M. Mizunami (2015) Conserved computational mechanisms underlying associative learning in insects and mammals. *Sci Rep* 5: 8929. DOI: 10.1038/srep08929. 査読有
- ③ M. Mizunami, Y. Nemoto, K. Terao, Y. Hamanaka, and Y. Matsumoto (2014) Roles of calcium/calmodulin-dependent kinase II in long-term memory formation in crickets. *PLoS*

ONE 9:9:e107442. DOI: 10.1371/journal.pone.0107442. 査読有

- ④ Y. Matsumoto, J.C. Sandoz, J.M. Devaud, M. Mizunami and M. Giurfa (2014) CNG channels and calmodulin intervene between NO-cGMP signaling and cAMP-PKA signaling olfactory long-term memory formation in the honeybee *Apis mellifera*. *Learn. Mem.* 21: 272-286. DOI: 10.1101/lm.032037.113. 査読有
- ⑤ C.S. Matsumoto, H. Shidara, K. Matsuda, T. Nakamura, T. Mito, Y. Matsumoto, K. Oka and H. Ogawa (2013) Targeted gene delivery in the cricket brain, using in vivo electroporation. *J. Insect Physiol.* 59: 1235-1241. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2013.10.001. 査読有
- ⑥ Y. Matsumoto, D. Hirashima, K. Terao and M. Mizunami (2013) Roles of NO signaling in long-term memory formation in visual learning in an insect. *PLoS ONE* 8:7:e68538. DOI: 10.1371/journal.pone.0068538. 査読有
- ⑦ Y. Matsumoto, D. Hirashima and M. Mizunami (2013) Analysis and modeling of neural processes underlying sensory pre-conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 101: 103-113. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.01.008. 査読有
- ⑧ C.S. Matsumoto, T. Kuramoshi, Y. Matsumoto, H. Watanabe, H. Nishino and M. Mizunami (2013) Participation of NO signaling in formation of long-term memory in salivary conditioning of the cockroach. *Neurosci. Lett.* 541:4-8. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.01.010. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 松本幸久、松本 - 佐藤千尋、丸山雄介、服部淳彦: Melatonin rescues age-related memory impairment in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (加齢コオロギにみられる長期記憶障害に対するメラトニンの抑制効果)、日本比較生理生化学会・比較内分泌学会合同大会、2015 年 12 月 11 日、JMS アステールプラザ (広島)
- ② 松本幸久【招待講演】コオロギの記憶の分子メカニズム、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 18 日、朱鷺メッセ (新潟)
- ③ 松本幸久、松本 - 佐藤千尋、水波誠、丸山雄介、服部淳彦: メラトニンには加齢に伴う長期記憶形成障害を予防・回復させる効果がある - コオロギをモデル動物として、日本抗加齢医学会第 15 回大会、2015 年 5 月 29 日、福岡国際会議場 (博多)
- ④ 松本幸久、松本 - 佐藤千尋、水波誠、中野真樹、服部淳彦: 加齢コオロギにみられる長期記憶障害に対するメラトニンの抑制効果、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、東北大学 (仙台)
- ⑤ 松本幸久、松本 - 佐藤千尋、水波誠、中野真樹、服部淳彦: 加齢性記憶障害に対する一酸化窒素による回復とメラトニンの

長期投与の効果-コオロギをモデル動物として、日本抗加齢医学会第14回大会、2014年6月6日、大阪国際会議場（大阪）

- ⑥ **松本幸久**、松本 - 佐藤千尋、中野真樹、服部淳彦、水波誠：フタホシコオロギの加齢性記憶障害における飼育環境の影響、日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学（岡山）
- ⑦ **Y. Matsumoto**, D. Hirashima and M. Mizunami: Sensory preconditioning in the cricket *Gryllus bimaculatus*: Associations between neutral sensory stimuli. Neuro2013, 2013, June 22, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

〔図書〕（計5件）

- ① **松本幸久**、佐藤千尋、水波誠（2015）コオロギの古典的条件付け、「研究者が教える動物実験 第3巻 行動」、共立出版、pp. 182-187
- ② **松本幸久**、志賀向子（2015）コオロギ神経束への金属イオンの逆向性・順向性注入法、「研究者が教える動物実験 第2巻 神経・筋」、共立出版、pp. 39-43
- ③ **松本幸久**・水波 誠（2013）吻伸展反応、「行動生物学辞典」、東京化学同人、pp. 475
- ④ **Y. Matsumoto**, J.C. Sandoz and M. Giurfa（2013）Classical conditioning of the proboscis extension reflex in the honeybee. In: H. Ogawa, K. Oka (eds), *Advanced Methods in Neuroethological Research*. Chapter 2, pp. 15-35, Springer
- ⑤ M. Mizunami, **Y. Matsumoto**, H. Watanabe and H. Nishino（2013）Olfactory and visual learning in cockroaches and crickets. In: R. Menzel and P. Benjamin (eds), *Invertebrate Learning and Memory*. Chapter 41, pp. 549-560, Elsevier

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 幸久 (MATSUMOTO YUKIHISA)
東京医科歯科大学・教養部・助教
研究者番号：60451613