

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770053

研究課題名 (和文) 昆虫の加齢に伴う記憶障害の神経機構の解明

研究課題名 (英文) Neural mechanisms of age-related memory impairment in insect

研究代表者

松本 幸久 (MATSUMOTO YUKIHISA)

北海道大学・大学院理学研究院・研究員

研究者番号：60451613

研究成果の概要 (和文)：本研究ではコオロギの嗅覚学習、視覚学習、色覚学習のいずれについても、長期記憶の形成のみに加齢性記憶障害 (ボケ) がおこり、そのボケは一酸化窒素 (NO)-cGMP シグナル伝達系の作動薬の投与により完全に回復することを行動学的解析により明らかにした。またコオロギの長期記憶の形成過程において、NO-cGMP 系の上流でニコチン型アセチルコリン受容体が働いていることを明らかにした。さらに薬理行動学的手法により「コオロギのボケは加齢に伴う NO-cGMP 系の活性低下に起因する」という研究代表者の仮説を検証した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I revealed that crickets show age-related memory impairment (AMI) in long-term memory (LTM) formation in three types of learning; to associate either olfactory, visual pattern or color with water reward. The AMI in each type of learning were fully recovered by administration of agonists of NO-cGMP signaling pathway. I also revealed that in the LTM formation mechanism, nicotinic acetylcholine receptors play role upstream of NO-cGMP pathway. Additional experiments were performed to test whether degradation of NO-cGMP signaling is responsible for AMI in cricket LTM formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：加齢性記憶障害、嗅覚学習、視覚学習、色覚学習、長期記憶、一酸化窒素、昆虫

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う記憶能力の低下 (加齢性記憶障害) の神経機構の研究は学習・記憶の形成機構の解明に繋がるため動物生理学分野においても重要な課題である。研究代表者はフタホシコオロギの学習・記憶形成の神経機構の研究を行っており、コオロギの長期記憶の形

成過程において一酸化窒素 (NO)-環状 GMP (cGMP) シグナル伝達系が重要な役割を示すことを見出していた。さらに近年、私は加齢コオロギでは嗅覚学習の学習獲得や短期記憶の形成は正常だが、長期記憶だけが作られない、すなわち長期記憶の形成にのみ加齢性記憶障害がみられることを見出した。それら

の結果から研究代表者は「NO-cGMP系シグナル伝達系の活性が加齢に伴い低下し、それにより加齢性記憶障害が引き起こされる」という仮説が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は上記の仮説を実験的に検証することである。さらに、コオロギの脳のどこで加齢性記憶障害が起きているのかも調べる。

3. 研究の方法

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

(2)学習実験：学習訓練では、匂い、視覚パターンまたは色の条件刺激 (conditioned stimulus: US) と、水 (報酬) または塩水 (罰) の無条件刺激 (unconditioned stimulus: US) を対提示 (CS-US) した。嗜好性テストを訓練前と訓練後 (1時間後または1日後) に行い、その結果を比較し学習訓練の効果を評価した。成虫脱皮1週目のコオロギにおいて、訓練1日後の長期記憶の形成に必要な学習訓練の回数は、嗅覚報酬学習が3-4回、嗅覚罰学習が6回、視覚報酬学習と色覚報酬学習が共に8回である (いずれも訓練の間隔は5分間の spaced training)。嗅覚報酬学習において1回の学習訓練、もしくは訓練間隔を空けない学習訓練 (massed training) では、1時間後の短期記憶は形成されるが、1日後の長期記憶は全く形成されない。

(3)薬理：メチルリカコニチン (MLA: ニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChR) 阻害剤)、スコポラミン (ムスカリン型アセチルコリン受容体 (mAChR) 阻害剤)、MK-801 (グルタミン酸受容体阻害剤)、metergoline (セロトニン受容体阻害剤)、chelerythrine (PKC 阻害剤)、5-Azacytidine (DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤)、AEBSF (セリンプロテアーゼ阻害剤)、genistein (PTK 阻害剤)、NOR-3 (NO 発生剤)、8br-cGMP (cGMP アナログ)、8br-cAMP (cAMP アナログ)、ニコチン (nAChR 作動薬) などを血中投与し、学習や記憶に与える影響について調べた。

(4)NADPH 免疫組織化学法：低温麻酔したコオロギから脳を取り出し、0°Cの3.7%ホルマリンエタノール溶液で12分間固定し、0°Cの0.1M トリスバッファーでリンスした後、27°C

のNADPH, NBT, Triton X 溶液に2時間つけて発色し、実体顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1)研究室の飼育条件下 (室温 27 度、12 時間明暗周期) でのコオロギの平均寿命 (成虫脱皮してから死ぬまでの日数) は、雄と雌を一緒に飼育している場合では、雌雄ともに約14日であった。本研究では成虫脱皮1週目 (4-7日) のコオロギを若成体コオロギといい、成虫脱皮3週目 (18-21日) のコオロギを加齢コオロギということにする。

(2)加齢コオロギにおいて、嗅覚報酬学習の訓練前に膜透過型 cAMP (8br-cAMP) を血中投与すると、長期記憶が正常に形成された。この結果は、NO-cGMP 系の下流で働くと考えられている cAMP-PKA 系の賦活でも加齢性記憶障害の改善効果があることを示している。

(3)加齢コオロギに視覚報酬学習または色覚報酬学習訓練を行ったところ、いずれも訓練1時間後の短期記憶は正常であったが、訓練1日後の長期記憶は全くみられなかった。すなわち視覚学習と色覚学習は共に、嗅覚学習と同様に、長期記憶の形成にのみ加齢性記憶障害がみられた。視覚学習や色覚学習においても長期記憶に加齢性記憶障害がみられるという現象は無脊椎動物において初めての知見であるとともに、これらの結果は昆虫の加齢性記憶障害の普遍性を示す証拠となる発見である。

(4)嗅覚報酬学習、嗅覚罰学習、視覚報酬学習、色覚報酬学習の加齢性記憶障害はいずれも、訓練前に NO-cGMP 系の賦活剤 (SNAP, NOR-3, 8br-cGMP など) を投与することで正常なレベルまで回復した。これは、訓練の性質に関わらず、加齢性記憶障害が NO-cGMP 系の機能低下に起因することを示唆している。この結果は国内・国際学会において強いインパクトを与え、高く評価された。

(5)若成体コオロギにおいて、massed training の嗅覚学習訓練をし、直後に脳への caged NO の光解離法を行ったところ、訓練1日後の長期記憶が形成された。すなわち caged NO の光解離法により長期記憶が誘導できた。ただし、加齢コオロギで同様の実験を行うと、死亡率が極めて高くデータを集計できなかった。よりインタクトに近いプレパレーション作りなどの工夫が必要である。

(6)加齢コオロギと若成体コオロギの脳の NO 合成酵素 (NOS) の発現を NADPH 免疫組織

化学法で調べて比較したところ、若成体コオロギでは脳の領域のうちキノコ体の傘部と葉部は同程度に濃く染まっており、触角葉は薄く染まっていた。一方、加齢コオロギではキノコ体の葉部は濃く染まっていたが、傘部は触角葉と同様に薄くしか染まっていなかった。すなわち、若成体コオロギと比べて加齢コオロギではキノコ体傘部の NOS 発現量が低いといえる。これらの結果から、キノコ体傘部が長期記憶の形成の場であり、且つ加齢性記憶障害の場である可能性が示唆された。

(7) 若成体コオロギについて、嗅覚学習の長期記憶の形成に関わる生体分子を行動薬理で探索した。その候補分子としてニコチン型アセチルコリン受容体 (nAChR)、ムスカリン型アセチルコリン受容体 (mAChR)、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体、プロテインキナーゼ C (PKC)、DNA メチルトランスフェラーゼ、セリンプロテアーゼ、受容体型チロシンキナーゼ (PTK) に注目し、これらの阻害剤を若成体コオロギに投与し、嗅覚報酬学習の長期記憶の形成に影響を与えるかどうかを調べた。いずれの薬物も学習・記憶に対する阻害効果がみられたが、長期記憶の形成にのみ阻害効果を示したものは nAChR の拮抗薬である MLA だけであった。

(8) 先行研究より、若成体コオロギにおいて NOR-3 や 8br-cGMP を投与すると 1 回の学習訓練でも長期記憶を形成できる、すなわち長期記憶の誘導効果があることがわかっていた。本研究では新たに、nAChR の作動薬であるニコチンも、NOR-3 や 8br-cGMP と同様に長期記憶の誘導効果があることを示した。ニコチンに昆虫の長期記憶の誘導効果 (記憶の増強効果) があることを示したのは本研究が初めてである。

(9) 若成体コオロギに、嗅覚報酬学習訓練前に nAChR の拮抗薬と NO-cGMP 系の作動薬の同時投与を、または nAChR の作動薬と NO-cGMP 系の拮抗薬の同時投与を行ったところ、前者では長期記憶が形成されたのに対し、後者では長期記憶が全く形成されなかった。この結果から長期記憶の形成過程において nAChR が NO-cGMP 系の上流で働いていることが示唆された。昆虫の学習記憶の研究で NO-cGMP 系の上流で働く分子を実験的に特定したのは本研究が初めてである。

(10) 加齢コオロギにニコチンを投与した後に嗅覚報酬学習訓練を行ったところ、長期

記憶の加齢性記憶障害は全く改善されなかった。一方、NOR-3 や 8br-cGMP を投与すると加齢性記憶障害が完全に回復した。これらの結果は、加齢による機能低下が起きているのは nAChR ではなくそれより下流のシグナル伝達系であること、すなわち NO-cGMP 系の機能低下が加齢性記憶障害の原因であることを示唆している。これら一連の結果は国内外の学会で発表し、高い評価を受けた。

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 M. Mizunami and Y. Matsumoto Roles of aminergic neurons in formation and recall of associative memory in crickets. (2010, 11) *Front. Behav. Neurosci.* 4: 172 (11 page) 査読有り
- ② 水波 誠、松本幸久 「昆虫の匂い記憶の読み出しに関わるモノアミン作動性ニューロン」*Aroma Research* (2010, 2) 41: 53-57 (フレグランスジャーナル社, 三報社印刷, 東京) 査読なし
- ③ Y. Matsumoto, A. Hatano, S. Unoki and M. Mizunami, Stimulation of the cAMP system by the nitric oxide-cGMP system underlying the formation of long-term memory in an insect. *Neurosci. Lett.* (2009, 10) 467: 81-85 査読有り
- ④ M. Mizunami, S. Unoki, Y. Mori, D. Hirashima, A. Hatano and Y. Matsumoto, Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in appetitive and aversive memory recall in an insect. *BMC Biology* (2009, 8) 7: 46 査読有り
- ⑤ E. Perisse, V.D. Raymond, I. Neant, Y. Matsumoto, C. Leclerc, M. Moreau and J.C. Sandoz, Early calcium increase triggers the formation of olfactory long-term memory in honeybees. *BMC Biology* (2009, 6) 7: 30 査読有り
- ⑥ Y. Nakatani, Y. Matsumoto, Y. Mori, D. Hirashima, H. Nishino, K. Arikawa and M. Mizunami, Why the carrot is more effective than the stick: different dynamics of punishment memory and reward memory and its possible biological basis. *Neurobiol. Learn. Mem.* (2009, 5) 92: 370-380 査読有り
- ⑦ T. Takahashi, A. Hamada, K. Miyawaki, Y. Matsumoto, T. Mito, S. Noji and M. Mizunami, Systemic RNA interference for the study of learning and memory in an insect. *J. Neurosci. Methods* (2009, 1) 179: 9-15 査読有り

- ⑧ **松本幸久**、佐藤千尋 「昆虫の記憶関連分子：ショウジョウバエの学習・記憶変異体の研究から」、『比較生理生化学』26 (1): 12-22 (佐野商会印刷, 久留米) 2009年1月 査読有り

[学会発表] (計 16 件)

- ① **Y. Matsumoto**, C. Sato, T. Takahashi and M. Mizunami, NO-cGMP signaling is involved in age-related memory impairment in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Neuro2010 (Kobe, Japan) 2010, September 2-4
- ② **松本幸久**、フタホシコオロギの加齢性記憶障害と NO-cGMP シグナル伝達系、無脊椎動物神経科学研究会 (静岡) 2010年8月31日
- ③ **Y. Matsumoto**, C.S. Matsumoto, T. Takahashi and M. Mizunami, Age-related memory impairment and its pharmacological rescue in the cricket. The 9th Congress of the International Society for Neuroethology (Salamanca, Spain) 2010, August 2-7
- ④ C.S. Matsumoto, **Y. Matsumoto** and M. Mizunami, Effect of epinastine on acquisition and retrieval of appetitive olfactory memory in the cockroach. The 9th Congress of the International Society for Neuroethology (Salamanca, Spain) 2010, August 2-7
- ⑤ M. Mizunami, Sae Unoki and **Y. Matsumoto**, "Cognitive" aspects of insect classical conditioning revealed by studying the roles of aminergic neurons in associative memory recall. The 9th Congress of the International Society for Neuroethology (Salamanca, Spain) 2010, August 2-7
- ⑥ **松本幸久**・佐藤千尋・水波 誠、コオロギの匂い学習・記憶におけるアセチルコリン受容体の働き、日本比較生理生化学会第32回大会 (福岡) 2010年7月19日
- ⑦ **松本幸久**・水波 誠、フタホシコオロギにおける連合条件付けの訓練間隔と記憶の関係、日本比較生理生化学会第31回大会・第34回日本比較内分分泌学会大会合同大会 CompBio12009 (大阪) 2009年10月23日
- ⑧ **松本幸久**・山方恒宏・佐藤千尋・河野芳明・水波 誠、ゴキブリ触角葉における匂い刺激応答の光学計測、日本動物学会第80回大会 (静岡) 2009年9月17日
- ⑨ 水波 誠・仲谷嘉洋・**松本幸久**、なぜ罰記憶は報酬記憶より忘れやすいのか? 日本動物学会第80回大会 (静岡) 2009年9月17日
- ⑩ **松本幸久**・郭沛源・佐藤千尋・水波 誠、

フタホシコオロギの匂い学習・記憶とアセチルコリン受容体、日本動物学会第79回大会 (福岡) 2008年9月5日

- ⑪ 羽田野愛・**松本幸久**・水波 誠、コオロギの「習慣形成」—どれだけ訓練すれば学習行動は習慣になるのか? 日本動物学会第79回大会 (福岡) 2008年9月5日
- ⑫ 平島大輔・**松本幸久**・水波 誠、フタホシコオロギにおける感覚的事前条件付けの成立、日本動物学会第79回大会 (福岡) 2008年9月5日
- ⑬ 佐藤千尋・**松本幸久**・渡邊英博・水波 誠、ワモンゴキブリの嗅覚報酬学習におけるオクトパミン受容体阻害剤の影響、日本動物学会第79回大会 (福岡) 2008年9月5日
- ⑭ **松本幸久**・高橋俊文・佐藤千尋・水波 誠、フタホシコオロギの加齢性記憶障害、日本比較生理生化学会第30回大会 (札幌) 2008年7月21日
- ⑮ **松本幸久**・高橋俊文・佐藤千尋・水波 誠、フタホシコオロギの匂い学習の加齢性記憶障害、日本神経科学大会第31回大会 (東京) 2008年7月9日
- ⑯ 平島大輔・宇ノ木佐会・**松本幸久**・水波 誠、フタホシコオロギの視覚学習長期記憶における一酸化窒素の役割、日本神経科学大会第31回大会 (東京) 2008年7月9日

[図書] (計 2 件)

- ① 水波 誠、**松本幸久** 「コオロギの学習と記憶」、曾我部正博編、『動物の多様な生き方 (全5巻) 動物は何を考えているのか? : 学習と記憶の比較生物学』第4巻第1章第4節 (分担執筆 pp. 65-81) (共立出版) 2009年8月
- ② 水波 誠、**松本幸久** 「昆虫の学習を司る報酬系と罰系」、下澤楯夫・針山孝彦監修、『昆虫ミメティクス～昆虫の設計に学ぶ～』 (分担執筆 pp. 596-599) (NTS) 2008年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 幸久 (MATSUMOTO YUKIHISA)
北海道大学・大学院理学研究院・研究員
研究者番号: 60451613

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし