

A-12

ナメクジの匂い味覚条件付け学習におけるエピカテキンの影響

The effect of epicatechin on an odor-aversive conditioning in the land slug

○松井啓将¹, 藤田夏海¹, 新原天¹, 小松崎良将²*Keisuke Matsui¹, Natsumi Fujita¹, Ten Niihara¹, Yoshimasa Komatsuzaki²

Abstract: Epicatechin (EC), a food-derived flavonoid, has been known as an enhancing factor of memory formation in molluscs. Here we investigated the effect of epi on long-term memory formation of an odor aversive learning in the land slug, *Limax valentianus*. When slugs were preexposed to 15 µg/g of epi 1 h prior to the odor aversive training, which typically results in memory lasting ~3 days, they formed LTM lasting at least 1 week. The procerebrum (PC) of the land slug is a central nervous system for odor processing and learning. The PC shows an oscillatory local field potential at about 0.7 Hz. We studied at the level of neural activities in the PC how epi lead to the enhancing effects of the memory formation.

1. はじめに

緑茶などに含まれる植物由来のカテキン類には、神経保護作用などの様々な生理作用が知られている。緑茶の主要固形成分の1つであるエピカテキン (EC) は、水生軟体動物であるヨーロッパモノアラガイの呼吸活動に関するオペラント学習による記憶形成を促進させることが報告されている^[1]。しかしながら EC における記憶増強作用のメカニズムは全く分かっていない。そこで本研究では陸生軟体動物であるチャコウラナメクジを用いてその連合学習による記憶形成に対する EC の作用を検討した。ナメクジは哺乳類動物に比べ神経細胞が少なく、中枢神経系が比較的単純である。また、脳を解剖によって単離した場合、酸素供給を行わなくても長時間神経活動を続けることが可能である。外部からの刺激によって起こる反応は生まれながらにして持っている先天的な性質、学習などで身についた後天的な性質の2つに分けられる。これらの記憶構造を理解するうえで、ニューロンの数が少なく神経回路が比較的単純であるナメクジが実験動物として用いられてきた為、本研究でもナメクジを実験個体とした。本研究では、ナメクジの記憶形成に対する EC の作用メカニズムを解明するために、絶食させたナメクジに EC を注入した後、匂い味覚嫌悪条件付け学習を行い、条件付け刺激に対する記憶保持テストを行うことで、記憶形成に対する EC の作用を調べた。また学習後の個体の脳神経系を単離し電気生理的手法を用いて、匂い中枢である前脳葉に対する EC の作用メカニズムを検証した。

2. 実験方法

本研究では、実験室で飼育・繁殖させた5ヶ月齢のチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) を用いた。

1) 行動実験

1-1. ナメクジ匂い味覚嫌悪条件付け学習

実験に使用するナメクジを実験前に隔離して24時間以上絶食を行った。次に、絶食させたナメクジを1匹ずつ実験で使用するガラス板の上に20分以上のせ環境に馴れさせた。馴れさせたナメクジから5cm離れた位置に半円

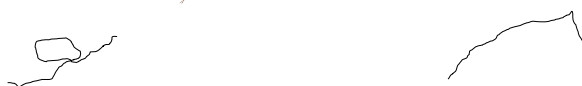


Figure 1. Odor aversive conditioning procedure. Carrot juice was used as a conditioned stimulus (CS). Quinidine sulfate was used as an unconditioned stimulus (UCS).

状（半径 5cm）になる様にガラス板にニンジンジュース（条件刺激, CS）をのせた. ナメクジがニンジンジュースに近づき食べる瞬間に 10.9mM のキニジン溶液 200 μ l（無条件刺激, UCS）を触覚の辺りにかけた. (ナメクジがガラス板の外に逃亡しようとする. または 5 分経過してもニンジンジュースに近づかなかった場合はキニジン溶液をかけず終了し, その際も 1 回実験を行ったとした.) 以上の実験を 3 回繰り返した. 最後に, ニンジンジュースから普段使用している餌に切り替えナメクジの行動を観察した. エサを食べようとしたらキニジン溶液はかけず実験を終了させた. ナメクジがガラス板の外に逃亡しようとする. または 5 分経過しても餌に近づかなかった場合も, 実験を終了させた.

1-2. 記憶保持テスト

記憶保持テストを行う 24 時間前から絶食させた. 絶食させたナメクジを 1 匹ずつ実験で使用するガラス板の上に 20 分以上のせ, 馴れさせた. ナメクジから 5cm 離れた位置に半円状（半径 5cm）になる様にニンジンジュースをのせた. 食べようとしたら終了とした. ナメクジがガラス板の外に逃亡しようとする. または 5 分経過してもニンジンジュースに近づかなかった場合も終了とした. 以上の実験を 3 回繰り返した. ニンジンジュースから普段使用している餌に切り替え, ナメクジの行動を観察した. このとき, エサを食べようとしてもキニジン溶液はかけず実験を終了した. ナメクジがガラス板の外に逃亡しようとする. または 5 分経過しても餌に近づかなかった場合も, 実験を終了した.

2) 電気生理実験

記憶保持テスト後に選別したナメクジを解剖し, 脳神経節を取り出した. 取り出した脳標本の前脳葉に吸引電極を当てて, その局所場電位を測定した.

3. 結果・考察

ナメクジに匂い嫌悪学習トレーニングを行い, その後記憶保持テストで確認したところ, エピカテキン(EP)投与群のみでトレーニング後 4 日以上で CS に対する嗜好性の低下が見られた(Fig. 2). このことより EC がナメクジの匂い嫌悪学習による長期記憶形成を促進することが分かった. またこのエピカテキンの神経系へ作用を調べるために電気生理学的手法を用いて, その匂い中枢である前脳葉の活動を測定した(Fig. 3). その結果, EC を投与して 10 分後に前脳葉のスパイク活動の周期が長くなることが観察された. EC を投与すると長期記憶が増強されることから, この前脳葉の活動調節作用はおそらく前脳葉と嗅覚神経系間におけるシナプス可塑性を高める働きがあると推測される. EC は抗酸化作用を示すことから^[2], 前脳葉ニューロンのミトコンドリアからの活性酸素放出を抑えることで, 活性酸素による細胞機能障害を抑え, その結果前脳葉のスパイク活動が遅くなり, シナプス可塑性を高めて, 最終的に長期記憶が増強されたのかもしれない. このことを示すためには, 嗅覚神経系が前脳葉に投射して形成されたシナプスの可塑性に対するエピカテキンの作用を調べる実験が必要である.

4. 参考文献

[1] L. Fruson, S. Dalesman and K. Lukowiak: “A flavonol present in cocoa [(-)epicatechin] enhances snail memory”, J Exp Biol, Vol.215, pp3566-76, 2012.
 [2] M. Assuncao and J.P. Andrade, “Protective action of green tea catechins in neuronal mitochondria during aging.”, Front Biosci (Landmark Ed), Vol.20, pp247-62, 2015.

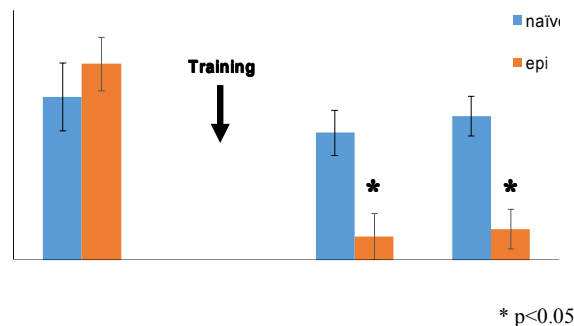


Figure 2. Epicatechin (15 mg/l) enhances long-term memory (LTM) formation of odor aversive conditioning

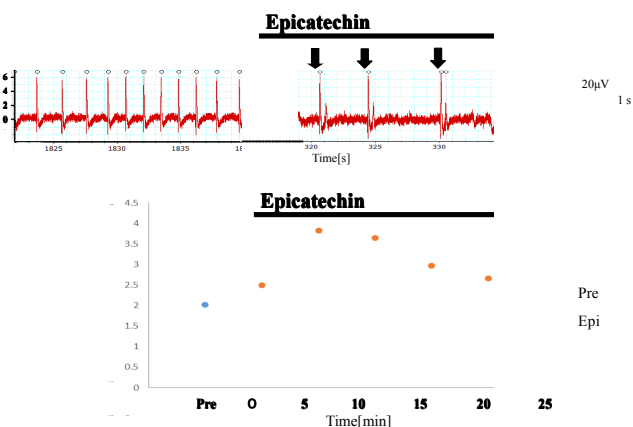


Figure 2. Epicatechin (15 mg/l) enhances long-term memory (LTM) formation of odor aversive conditioning in