

A-9

味覚嫌悪学習に関わる GABA 神経回路の同定 GABAergic system involved in taste-aversion conditioning of pond snail

村上 純平¹, 小松崎 良将²

Junpei Murakami¹, Yoshimasa Komatsuzaki²

Abstract: *Lymnaea stagnalis* can acquire a long-term memory of taste aversive conditioning learning. Central giant cell (CGC) is a necessary site for long-term memory formation of the taste aversive conditioning, and exhibits spontaneous oscillation of action potentials. In our previous studies, we have shown that Gamma-aminobutyric acid (GABA). Also, Bicuculline is known to inhibit the GABA-A receptor. In this study, we investigated the effect of GABA and Bicuculline on activity of CGC.

1. はじめに

中枢神経系の高次機能（学習・記憶、情動など）を解明するために、様々なモデル動物が用いられている。その中でも軟体動物（カタツムリ、ナメクジ、アメフラシ等）の脳（神経節）は、神経細胞の数が少なく（1つの神経節でニューロンが数百〜数千個程度）、神経回路が比較的単純であるので、その理解が比較的容易である。また、ニューロンが比較的大きいので、微小ガラス電極を用いた電気生理測定による個々の細胞の活動を調べなど、組織学的研究による神経回路の同定が行われてきた。ヒトの心拍数が1/fゆらぎのような長期相関を持ったゆらぎを示すことが知られている。また、このゆらぎ特性は生物の内部状態の重要な情報を与える。ゆえにゆらぎ特性を明らかにすることで、細胞内の複雑な活動でも簡単で一般的な性質を同定することが期待出来る[1]。そこで本研究では淡水性カタツムリの一種のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea Stagnalis*) を用いて、単一細胞の複雑な活動パターンを観測した。神経節の1つであるcerebral ganglion には食餌行動における咀嚼リズムに関与する巨大神経細胞 (cerebral giant cell; CGC) が存在し、自発的な脱分極活動を行う。このCGCの膜電位変化が、結果として咀嚼行動を引き起こす運動ニューロンの活動を変調させることで、条件付け後の咀嚼行動の変化を引き起こすと考えられている。加えて、生体より摘出したCGCは生理食塩水で長時間生かしておくことが可能である。また、先行研究においてγ-アミノ酪酸 (GABA) がCGCに影響を与えることが示されている[2]。本研究では、GABA-A受容体を阻害することが知られているビククリン(Bicuculline)を用い、GABAと

BicucullineがCGCの活性に及ぼす影響について検討した。

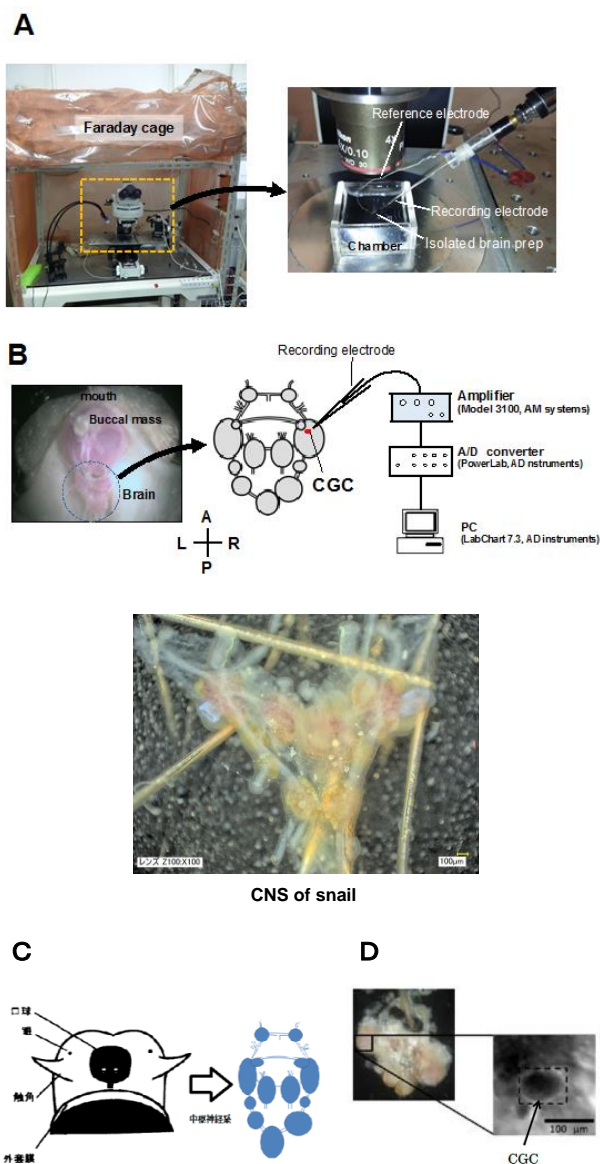


Figure 1. (A) is Experimental device. (B), (C) and (D) are the central nervous system.

1: 日大理工・学部・物理 2: 日大理工・教員・物理

2. 実験方法

2-1. 味覚嫌悪学習

無作為に抽出したヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) に番号を振った上で 24 時間絶食状態に置き、その後実験を行った。絶食を行うことで咀嚼回数が活発となり学習行動を取りやすくするためである。まず、10 mM スクロース (sucrose) 溶液に 15 秒間浸け、その後溶液を抜き取り人工飼育水 (PW, artificial pond water) に浸した状態で 5 分間の咀嚼回数を測定した。その際、個々の個体は別の容器に入れた状態で行った。この結果、咀嚼回数が一定水準を満たさない個体に関しては実験を中止した。これは、学習後に咀嚼回数の変化が判断しにくい為である。その後、味覚嫌悪学習を行うコントロール個体と学習個体に分けて条件付けを行った。(以上をプレテストという) プレテストを終了したのち、30 分程時間を置き条件付けを行った。学習個体は、人工飼育水 (PW) を抜き取り、10 mM スクロース (sucrose) 溶液 (条件刺激) に 15 秒間浸した。次に、スクロース (sucrose) 溶液を抜き取り、10 mM KCl 溶液 (無条件刺激) に 15 秒間浸した。最後に、KCl 溶液を抜き取り、人工飼育水 (PW) で満たし 9 分 30 秒放置した。このサイクルを計 10 回繰り返して行った。コントロール個体はスクロース (sucrose) 溶液と KCl 溶液を人工飼育水 (PW) で行い、溶液入れ替えによるストレスの影響基準のサンプルとした。(以上を条件付けという) 条件付けから 1 時間後に 10 mM スクロース (sucrose) 溶液に 15 秒間浸け、その後溶液を抜き取り人工飼育水 (PW, artificial pond water) に浸した状態で 5 分間の咀嚼回数を測定した。その結果プレテストと比較することによって、成績に応じ学習個体を Good learner と Poor learner に分類した。また、コントロール個体 (Naïve) も測定結果と比較を行い、逸脱している個体に関しては実験を中止した。

2-2. 電気生理

これらの個体を実体顕微鏡を用いて解剖を行い、中枢神経系 (the central nervous system) を摘出し、そこから単離した CGC の電気的活動を記録した。その際、中枢神経系は虫ピンで固定し、生理食塩水 4.5 ml で満たした。次に、光学顕微鏡下で単離した神経節の CGC に微小ガラス電極 (tip: $\sim 0.5 \mu\text{m}$) を刺し細胞内電位を記録した。検出できる電位は非常に小さい為、アンプを用いて増幅させ、コン

ピュータで記録した。波形が安定したのち、10mM

Bicuculline in ジメチルスルホキシド (DMSO, Dimethyl sulfoxide) を 5 μl 加え、その後 10 分後に 10mM GABA in 生理食塩水を 0.5 ml 加えて、変化を確認した。最終的に溶液の濃度は Bicuculline 10 μM , GABA 1mM となる。これらの結果を比較することによって GABA と Bicuculline が CGC の活性に及ぼす影響について検討した。

3. 結果, 考察

電気生理実験を行い、Good learner と Poor learner で CGC の発火頻度に図のような違いがみられた。また、先行研究により γ -アミノ酪酸 (GABA) が CGC に影響を与えることが示されているので、GABA-A 受容体を阻害することが知られているビククリン (Bicuculline) を投与して実験を行ったが、判断材料として不足しているため講演会直前まで実験を行い結果として示す予定。

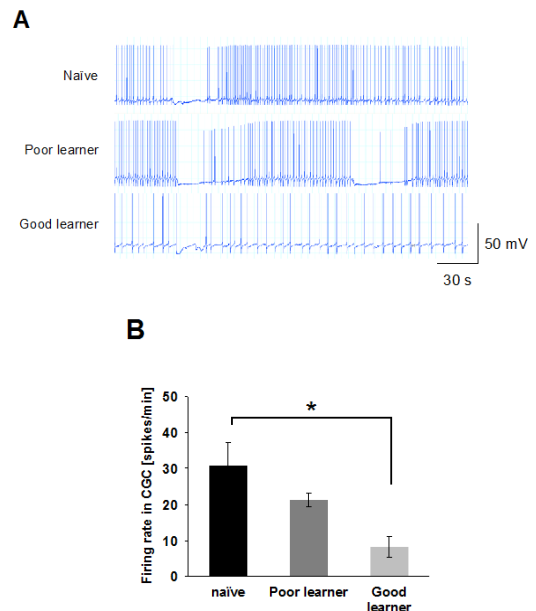


Figure 2. Spontaneous activity of CGC following the CTA training. The CGC firing rate of good learner significantly decreased to 8.3 ± 3.0 spikes/min compared with naïve snails ($*P < 0.05$).

4. 参考文献

- [1]. Takahiro Harada, Tomomi Yokogawa, *et al.*: "Singular Behavior of Slow Dynamics of Single Excitable Cells", *Biophysical Journal*, Vol. 96, pp255-267, (2009).
- [2]. Yoshimasa Komatsuzaki, Kouya Kato, Ken Lukowiak, Minoru Saito *et al.*: "The effect of GABA on serotonergic neuron CGC modulated by taste aversive conditioning in pond snail".