

匂い味覚条件付け学習による記憶形成に対する熱ストレスの影響

The effect of thermal stress on memory formation of odor-aversive conditioning in the land slug

○小川将平¹, 川本空良¹, 小松崎良将²Shohey Ogawa¹, Sora Kawamoto, Yoshimasa Komatsuzaki²

Abstract: Stress alters the ability of memory formation and memory retrieval. The relationship between arousal (stress level) and memory performance can be linear or curvilinear, depending on the difficulty of the task, which is called Yerkes-Dotson 'law'. Mild stressors (thermal stress, a single application of KCl exposure and silver nanoparticles) enhance long-term memory formation. In our present study, we test whether thermal stress (30°C, 30 min) enhance the memory formation of odor-aversion conditioning in the land slug, *Limax valentianus*.

1. はじめに

生物は環境から温度、湿度、匂いなど様々な因子を受け取っている。このような環境の変化を捉え適応するために、これらの情報を記憶することは生存のために非常に重要である。これらの環境変化は多くの場合生物にとってストレスとして感受される（例えば、天敵の匂いや急激な気候変動による温度変化など）。生体が環境からストレスを受け取るとそれを脳が感受し脳を含めた生体の様々な器官に“闘争か？逃走か？（fight-or-flight）”と呼ばれる生理的応答を促す。このようなストレス応答は、長期記憶形成を促したり、逆に阻害したりする。ストレスレベル（覚醒度）と学習成績（記憶形成能）との間には逆 U 字の関係がある。すなわち、全くストレスがない場合や非常に強いストレス下に置かれるとその学習成績は落ちるが、中程度（マイルド）なストレス下では学習成績が上がるということが経験的に知られている（Yerkes-Dotson 法）。最適なストレスレベルにおいてその記憶形成が増強されることは、哺乳類や軟体動物など様々な生物種において報告されている^[1,2]。水生軟体動物であるヨーロッパモノアラガイに対して 30°C で 1 時間の熱ショックストレスを与えた直後に、30 分間の呼吸行動に関するオペラント条件付け学習を 1 回だけ行っても（通常は長期記憶が形成されないようなトレーニング）、24 時間続くような長期記憶が形成されるようになる^[3]。しかしながらこのような熱ショックストレス（heat shock stress）がどのような仕組みで記憶形成を増強するのか分かっていない。

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において匂い味覚条件付け学習トレーニングによる記憶形成に対する熱ショックストレスの影響を

検証した。軟体動物に熱ショックストレスを与えると熱ショックタンパクである HSP40 と HSP70 の発現が増えることが知られている^[4]。そこで本研究ではこの熱ショックタンパクに対して阻害効果を持つことが知られている quercetin を用いて、熱ショックストレスによる記憶増強作用に HSP40・HSP70 がどのように関与するのか検証した。

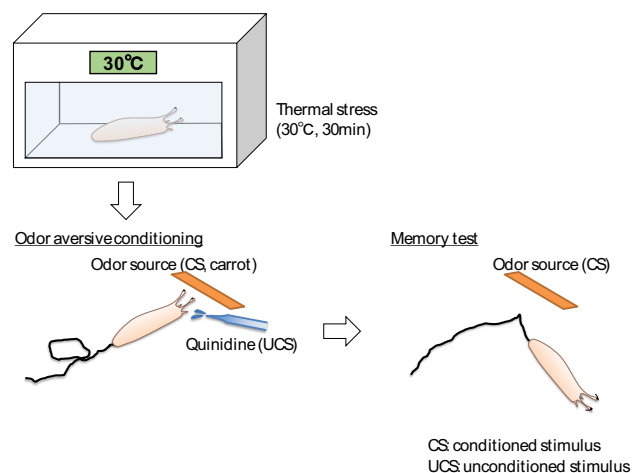


Figure 1. The procedure of odor-aversive conditioning and thermal stress in land slugs. Training consisted of applying an aversive stimulus (application of quinidine, UCS) to the mouth as the snail attempt to eat odor source (carrot, CS).

2. 実験方法

2-1. 実験動物

チャコウラナメクジは当研究室にて 13 世代以上継代して飼育した体重 1~2g ものをを用いた。ナメクジは 19°C に保っておいた恒温装置内で明暗サイクルを 12h:12h にして十分なエサ（ラット用粉末飼料 521g,

1 : 日大理工・学部・物理, 2 : 日大理工・教員・物理

小麦デンプン 500g, 混合ビタミン 21g) を与えて飼育した。

2-2. 学習実験方法 (Fig.1)

実験に使用するナメクジはその 2 日前から絶食させておいた。条件付け学習を行う直前にあらかじめ 30°C に保っておいた恒温装置にナメクジを 30 分間置いておくことで、熱ショックストレスを与えた。予備実験において 1 時間以上 30°C の環境下に置いたナメクジはその生存率が著しく低下していたため 30 分間が熱ショックストレスを与えるのに最適な時間であった。ストレスを与えた後、あらかじめニンジンジュース (条件刺激, CS) を置いたガラス板の上にナメクジを置きその行動を観察した。ナメクジがニンジンに近づいて食べようとしたときに、忌避物質である硫酸キニジン (無条件刺激, UCS) をナメクジの口に目掛けて与えた。

2-3. 記憶テスト

ナメクジの学習が成立しているか確かめるために、一定の時間を空けて記憶テストを行った。ナメクジをテストの環境に慣れさせるために 20 分以上ガラス板の上で静置した後、ニンジンジュースをナメクジから 5cm 離れたところに置き、その行動を観察した。3 回同様の操作を行い、近づいた割合を “preference level” として学習成立の指標とした。

3. 結果

学習の直前に熱ショックストレスを与えると、72 時間後においても記憶保持していることが分かった (Fig.3)。熱ショックストレスを与えていない群では記憶保持が見られなかった。また、学習曲線上において目立った違いは見られなかった (Fig.2) ことから熱ショックストレス自体がナメクジの行動に強く影響を与えてはいないと考えられる。

4. 考察

熱ショックストレスを与えることにより、ナメクジの長期記憶の形成を促進させることがわかった。この熱ショックストレスによる記憶増強作用は、heat shock protein (HSP) が賦活されることがトリガーとなるかもしれない。本発表において、この熱ショックストレスによる記憶形成の亢進作用メカニズムを検証するため熱ショックタンパク質の阻害剤 (quercetin) 投与による作用の解析結果を含めて発表する。

5. 参考文献

[1] Kim, JJ. and Diamond, DM., “The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories.”, *Nat. Rev. Neurosci.*, Vol.3, pp.453-462, 2002.

[2] Lukowiak, K. et al., “Ecologically relevant stressors modify long-term memory formation in a model system.”, *Behav. Brain Res.*, Vol.214, pp.18-24, 2010.

[3] Teskey, ML. et al., “What's hot: the enhancing effects of thermal stress on long-term memory formation in *Lymnaea stagnalis*.”, *J. Exp. Biol.*, Vol.215, pp.4322-9, 2012.

[4] Sunada, H. et al., “Heat stress enhances LTM formation in *Lymnaea*: role of HSPs and DNA methylation.”, *J. Exp. Biol.*, 219, pp.1337-45, 2016.

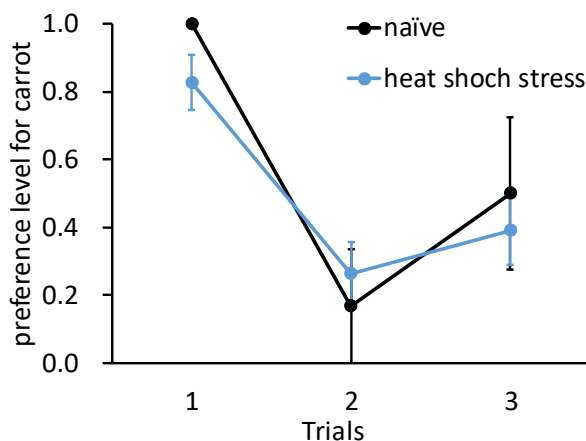


Figure 2. The learning curve of odor-aversive conditioning in land slugs.

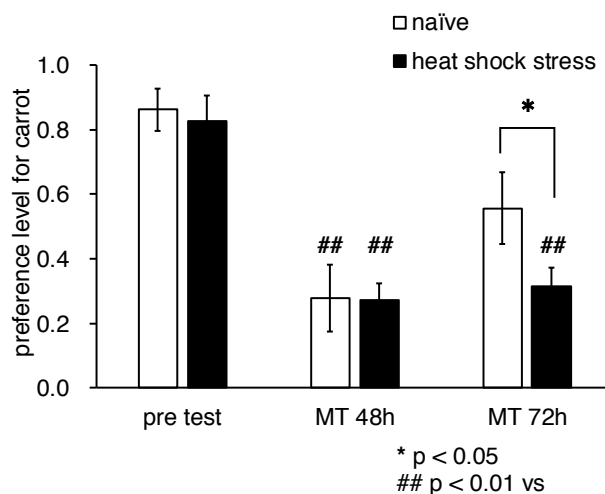


Figure 3. The heat shock stressor enhanced long-term memory formation when applied to slugs after odor-aversive conditioning.