

## A-3

## 緑茶由来エピカテキンの記憶増強作用に対する行動学的・電気生理学的研究

### Behavioral and electrophysiological study of the enhancing effect of epicatechin on odor aversive learning

○松井啓将<sup>1</sup>, 石塚京花<sup>2</sup>, 手塚光貴<sup>2</sup>, 小松崎良将<sup>3</sup>Keisuke Matsui<sup>1</sup>, Kyouka Ishizuka<sup>2</sup>, Kouki Tezuka<sup>2</sup>, Yoshimasa Komatsuzaki<sup>3</sup>

**Abstract:** We focus the effect of Epicatechin (EpiC), a flavanol found in many foods (e.g. green tea and cocoa powder), on the present study. Here we investigated the effect of EpiC on long-term memory formation of an odor aversive learning in the land slug, *Limax valentianus*. When slugs were pre-exposed to 15 µg/g solution of EpiC 1h prior to the training, which typically results in memory lasting ~3 days, they formed LTM lasting at least 2 weeks. The procerebral cortex (PC), the center of odor processing, shows an oscillatory local field potential at about 0.7 Hz, which is modulated by conditioned odor stimuli. To demonstrate the effect of EpiC on the synaptic transmission between the tentacle nerve and the PC, we recorded the evoked excitatory post-synaptic potential (EPSP) from the PC.

## 1. はじめに

植物フラボノイドであるカテキン類は、抗酸化作用や老化抑制作用など様々な生理活性を持つことが報告されており、その作用やメカニズムが注目されている。緑茶カテキンの1つであるエピカテキン (EpiC) は、近年の研究で軟体動物の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<sup>[1]</sup>。我々の先行研究において、匂い味覚嫌悪条件付け学習前に EpiC を腹腔内投与すると記憶が一週間以上保持されることがわかった。また、エピカテキンと同じく緑茶に多く含まれる没食子酸エピガロカテキンは虚血による長期増強現象 (LTP) の減少を食い止める作用を持つ<sup>[2]</sup>。このように緑茶カテキンは神経系の記憶学習に関わる作用が知られているが、そのメカニズムはわかっていない。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これら緑茶カテキンの作用を検討した。ナメクジは古典的条件付け学習による記憶学習能を持つことが古くから知られており、また哺乳類などに比べてニューロンの数が少なく神経回路が比較的単純であることから、記憶学習機能を調べるためのモデル動物としてよく用いられてきた。本研究では、先行研究で報告された EpiC の匂い味覚嫌悪条件付け学習に対する記憶増強作用を追試するとともに、その作用メカニズムを調べる為に、電気生理学的手法を用いて触角神経-前脳葉シナプスにおける可塑性に対する EpiC の影響を調べた。

## 2. 実験方法

## 2-1. ナメクジ匂い味覚嫌悪条件付け学習

本研究では、実験室で飼育・繁殖させたチャコウラナメクジ (4ヶ月齢以上, 1.0-2.0 g) を用いた (Fig.

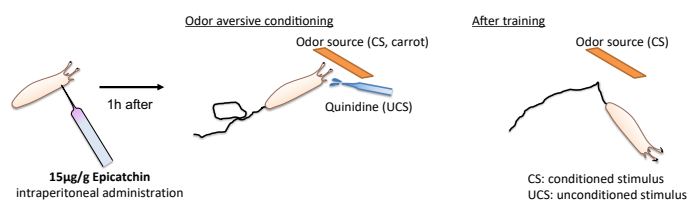
1). 無作為に選んだナメクジを隔離し行動実験の 24 時間以上前に絶食した。学習を行う 1 時間前に生理食塩水に溶かしたエピカテキンを体重の 20 分の 1 の量になるように腹腔内投与した。行動実験台 (ガラス板) に 20 分以上のせ環境に馴れさせた。その後、5 cm 離れた位置に半円状にニンジンジュース (条件刺激, CS) を置き、ナメクジがニンジンジュースに近づいて食べる直前に 10.9mM のキノジン溶液 (無条件刺激, UCS) を口付近にかけた。以上の実験を 3 回繰り返すことで、匂い味覚嫌悪条件付け学習とした。

## 2-2. 記憶保持テスト

学習後 1~2 週間後ナメクジを行動実験台 (ガラス板) に 20 分以上のせ環境に馴れさせた。その後、5 cm 離れた位置に半円状にニンジンジュース (条件刺激, CS) を置き、ニンジンジュースに対する行動を観察した。この試行を 3 回行い、近づいた割合をニンジンジュースに対する嗜好性 (preference level for CS) として評価した。

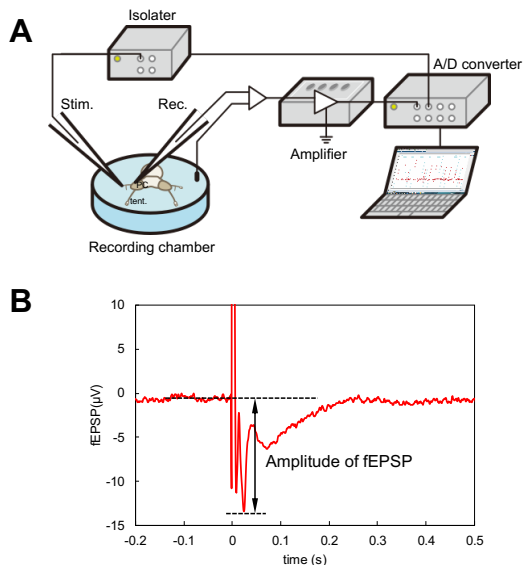
## 2-3 電気生理実験

高濃度  $Mg^{2+}$  溶液により麻酔した後、大・小触角とともに脳神経節を取り出した。取り出した脳標本を電気生理測定チェンバーに虫ピンで固定して培養液に浸しておいた。小触角神経-前脳葉のシナプス伝達効率を測



**Figure 1.** Protocol for intraperitoneal administration of epicatechin, and odor aversive conditioning.

定するために、小触角神経を切断し電流刺激を行うための吸引電極でその切断面を吸引した。ナメクジの嗅覚中枢である前脳葉に生じる後シナプス電位を捉えるために吸引電極を前脳葉の表面に固定し、その電位を測定した (Fig. 2)。刺激強度は最大応答の半分程度となるようにした (current intensity: +0.02mA)。測定開始から十分時間が経過しその活動が安定してから、測定チャンバーに、濃度が 15 mg/L になるよう EpiC を投与した。



**Figure 2.** Electrophysiological experiment for recording synaptic potential from inferior tentacle nerve to procerebral cortex (PC). We showed the typical waveform of field potential from the PC.

### 3. 結果

エピカテキン (EpiC) 投与群, naïve 群の行動実験結果を Fig. 3 に示した。条件付け学習前にニンジンジュースに対する嗜好性を調べるために行った pre test に比べて, EpiC 投与群のみが条件付け学習から 2 週間後に行った memory test での嗜好性に統計的に有意な差が見られた。嗅覚受容器である触角から前脳葉に神経投射して作るシナプス伝達に対する EpiC の作用を調べるために、触角神経への電気刺激により生じる興奮性シナプス電位 (field excited post-synaptic potential, fEPSP) 測定を行なった (Fig. 4)。その結果, EpiC を投与後に, fEPSP の振幅が大きくなる傾向が見られた。

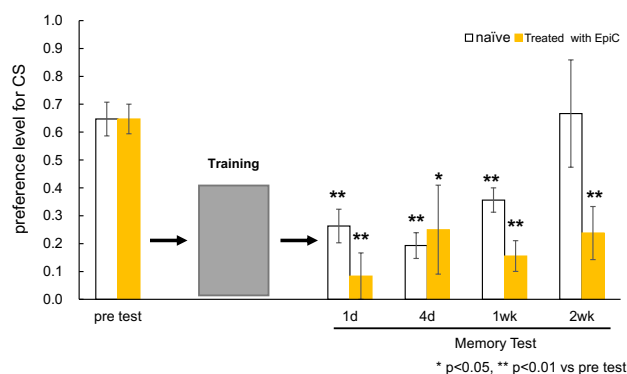
### 4. 考察

エピカテキン (EpiC) が軟体動物の記憶形成を増強する作用が報告されている。本研究において, EpiC を直接ナメクジの脳神経節に投与しても, 長期記憶形成

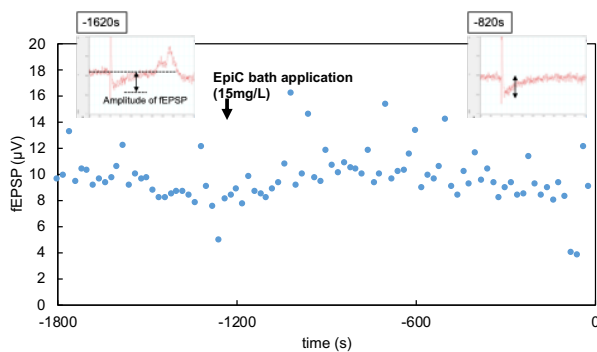
を強化し 2 週間以上その記憶を保持することが分かった。先行研究より, 前脳葉 (PC) における自発的な神経活動に影響を与えないことから, 神経可塑的活動に対して EpiC がその作用を発揮すると推測される。そこで, fEPSP に対する EpiC の影響を調べたところ, 後シナプス電位を増大させる傾向が見られた。この作用は数分以内に生じることから, EpiC がシナプスに存在するイオンチャンネルに直接作用する, もしくは後シナプス細胞内のリン酸化経路を介して後シナプス電流を増大させるような作用機序が考えられる。

### 5. 参考文献

[1] Knezevic B, Komatsuzaki Y, de Freitas E, Lukowiak K., “A flavanoid component of chocolate quickly reverses an imposed memory deficit.”, *J Exp Biol*, 219, pp.816-23, 2016.  
 [2] Ding JI, Fu G, Zhao Y, Cheng Z, Chen Y, Zhao B, He W, Guo LJ., “EGCG ameliorates the suppression of long-term potentiation induced by ischemia at the Schaffer collateral-CA1 synapse in the rat.”, *Cell Mol Neurobiol*, 32(2), pp267-77, 2012.



**Fig. 3** The effect of EpiC for odor aversive conditioning (training). EpiC treated slugs had the memory 2 weeks after the training, whereas naïve slug did not have the memory.



**Figure 4.** Electrophysiological experiment for recording synaptic potential from inferior tentacle nerve to procerebral cortex.