

A-7

ナメクジ嗅覚神経回路の電気生理学特性に対する緑茶カテキンの影響

The effect of epicatechin on electrophysiological properties of olfactory nervous system in the terrestrial slug

○永田彩¹, 小松崎良将²Aya Nagata¹, Yoshimasa Komatsuzaki²

Abstract: We investigate the effects of epicatechin (EpiC) on the olfactory central nervous system of *Limax valentianus* by using an electrophysiological technique. We found that the amplitude of excitatory post-synaptic potentials (EPSP) increased within ten minutes after administration of EpiC. After high frequent stimulation, a reduction of EPSP amplitude in the EpiC-treated group lasted longer than that in control group. That phenomenon is similar to a long-term depression (LTD) which is one of synaptic plasticity. These results suggest that EpiC directly affects a synaptic connection between olfactory organ and olfactory central nervous system to cause memory enhancement.

1. はじめに

近年、植物に含まれるフラボノイドが、無脊椎動物を含む様々な生物の認知機能を向上させることが報告されている^[1]。中でも緑茶やココアに豊富に含まれているエピカテキン (EpiC) は、病気の予防や医薬への応用研究を通じて、健康長寿の貢献に繋がることが期待されている^[2]。我々の先行研究において EpiC が 2 種類の連合学習 (味覚嫌悪学習, 呼吸系のオペラント条件付け学習) による記憶形成を増強することを示した^[3,4]。このように、EpiC による記憶増強作用は哺乳類・軟体動物において報告されているが、記憶学習機能を支える細胞間情報伝達機構に対してどのような影響を与えるのかは未知である。そこで本研究では、高度に発達した嗅覚系記憶システムを持つ陸生軟体動物のチャコウラナメクジをモデル動物として、その嗅覚器官 (大触角) - 嗅覚中枢 (前脳葉, *procerebral cortex* (PC)) で作られる神経シナプス (神経細胞間情報伝達の間) に着目した。ナメクジは神経細胞が十万個程度と比較的単純な中枢神経系を持っており、脳中枢神経系を解剖によって単離した場合でも、シャーレ上で長時間活動を続けることが可能であるため、その神経活動を電気生理学的手法により測定するのに非常に有用である。ナメクジの匂い受容器は大触角の先端にあり、触角神経節を介して嗅覚中枢神経系である前脳葉と神経連絡している。この前脳葉は、ナメクジの匂いに関する学習・記憶の形成に必須の器官でもある^[5]。本研究では、電気生理学的手法を用いて、触角神経を電気刺激したときの前脳葉におけるシナプス応答を計測することで、EpiC が細胞レベルでどのような影響を与えるのかを調べた。

2. 実験方法

本研究では、当実験室で 18 世代以上継代して飼育・繁殖させたチャコウラナメクジ (*Limax valentianus*) を用いて、次の手順で行った。まず、無作為にナメクジを選び、麻酔溶液 (高濃度 Mg^{2+} 溶液) で麻酔した後、大触角 - 触角神経 - 脳神経節標本を取り出した。取り出した標本は、生理食塩水で満たした電気生理測定チェンバーに虫ピンで固定しておいた (Fig. 1)。次に、大触角神経 - 前脳葉のシナプス応答を測定するために、前脳葉背側の表面に記録電極を軽く刺した。また、第触角神経を中程で切断し、サクシオン電極で吸引した。触角神経を電圧刺激することで、触角神経末端と前脳葉神経細胞が作るシナプスでシナプス電流が流れるため、記録電極によりシナプス周辺に生じる電位変化 (興奮性シナプス後電位, EPSP) を記録することができる。刺激強度は、このシナプス応答の最大値の半分程度になるように決めた。測定開始からシナプス応答が安定するまで 1-1.5 時間程度待ってから、終濃度が 15mg/L になるよう EpiC をチェンバーに滴下した。それから 30 分程度経過した後、高頻度刺激 (100Hz, 1 秒間を 4 セット) を行った。さらに 1 時間程度経

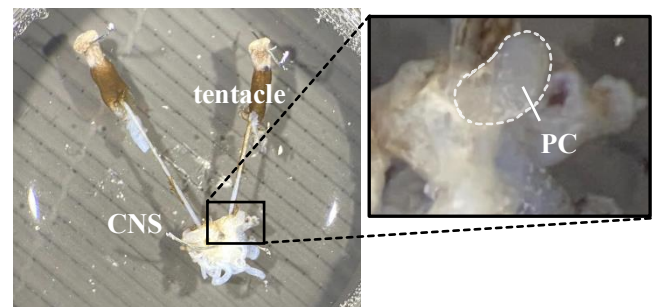


Figure 1. Preparation of the nose - central nervous system (CNS) preparation of the land slug, *Limax valentianus*.

過後、高頻度刺激前後のシナプス応答を比較することで、シナプス可塑性に対する EpiC の影響を調べた。

3. 結果

興奮性シナプス後電位 (EPSP) の振幅に対する経時変化を Fig. 2A に示した。Control 群では EPSP 振幅に大きな変化が見られなかったのに対し、EpiC を投与すると数分後に EPSP 振幅が大きくなり、その状態が続いた。また、高頻度刺激 (tetanus stimulation: (100Hz, 1s) ×4) を与えると EPSP 振幅の減少が続く現象が見られた。このことから、高頻度刺激によりシナプス可塑性の一つである長期抑制 (LTD : long-term depression) 様の現象が生じたと考えられる。このシナプスの機能的変化であるシナプス可塑性は、記憶形成の素過程と考えられている。Control 群では刺激後 60 分で刺激前の EPSP 振幅まで回復したが、EpiC 投与群では、刺激

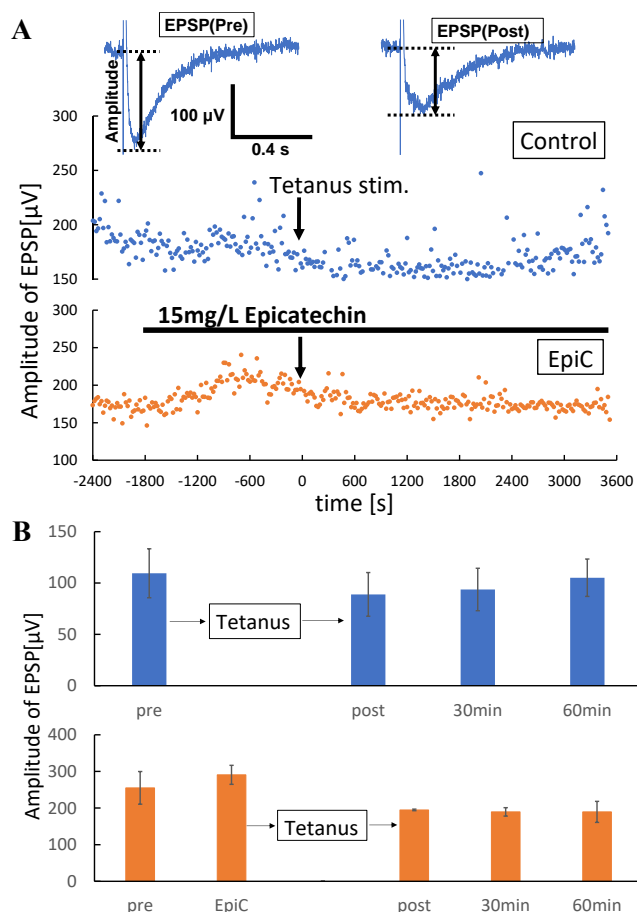


Figure 2. Effect of epicatechin (EpiC) on electro-physiological properties of olfactory nervous system. (A) The timeline of EPSP (upper) in slug saline (Control) or EpiC-containing saline (EpiC). (B) Comparison of mean amplitude of EPSP between control (n=5) and EpiC group (n=5).

後 60 分経過しても EPSP 振幅が低下した状態が続くことが分かった (Fig. 2B).

4. 考察・まとめ

本研究において、ナメクジ中枢神経系のシナプス伝達特性に対する EpiC の影響を初めて実証した。EpiC を投与して数分後に EPSP 振幅が大きくなったのは、EpiC が触角-前脳葉シナプス内の細胞内情報伝達系を介してシナプス膜に存在するイオンチャネルを賦活化しイオンコンダクタンスが上昇したためだと考えられる。また、高頻度刺激後に触角-前脳葉シナプスにおいて LTD 様の現象が生じたことが分かった。哺乳類では自転車の乗り方や楽器演奏などの運動学習は小脳で行われており、この小脳運動学習が細胞レベルにおける LTD 現象によって実現されていることと報告されている^[6]。そのため、ナメクジの匂いに関する学習・記憶の形成においても、哺乳類の小脳と同じ様式である可能性が示唆される。また、EpiC を投与すると Control 群に比べて LTD 様現象が強く発現したことから、これが EpiC による記憶増強における神経ネットワークレベルでの機能的作用であるかもしれない。

5. 参考文献

- [1] van Praag, H., Lucero, M. J., Yeo, G. W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J. et al.: "Plant-derived flavonol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice", *J Neurosci.*, Vol.27, pp5869-78, 2007.
- [2] 原征彦: 「茶カテキン類の機能性とそれらの応用例」,
- [3] Knezevic, B., Kmatsuzaki, Y., de Freitas, E. and Lukowiak, K.: "A flavonoid component of chocolate quickly reverses an imposed memory deficit", *J Exp Biol.*, Vol.219, pp816-23, 2016.
- [4] Itoh, A., Komatsuzaki, Y., Lukowiak, K., Saito, M.: "Epicatechin increases the persistence of long-term memory formed by conditioned taste aversion in *Lymnaea*", *J Exp Biol.*, Vol.224, No.3, pp.1-5, 2021.
- [5] 山口恒夫, 富永佳也, 桑澤清明, 共編: 「もうひとつの脳 微小脳の研究入門」, 培風館, pp100-114.
- [6] Kakegawa, W., Katoh, A., Narumi, S., Miura, E., Motohashi, J., Takahashi, A., Kohda, K., Fukazawa, Y., Yuzaki, M., and Matsuda, S.: "Optogenetic Control of Synaptic AMPA Receptor Endocytosis Reveals Roles of LTD in Motor Learning", *Neuron*, Vol.99, No.5, pp985-998.e6, 2018.