

淡水産巻貝の学習・記憶能力に関連する
中枢神経系内インスリンシグナル伝達の分子機構

Molecular mechanisms of insulin signaling in the central
nervous system related to learning and memory ability in the
pond snail

2024年2月

中居 詢子

Junko NAKAI

淡水産巻貝の学習・記憶能力に関連する
中枢神経系内インスリンシグナル伝達の分子機構

Molecular mechanisms of insulin signaling in the central
nervous system related to learning and memory ability in the
pond snail

2024 年 2 月

早稲田大学 大学院先進理工学研究科
生命理工学専攻 物理生物学研究

中居 詢子

Junko NAKAI

目次

遺伝子名略称一覧	iv
その他略称一覧	v
第 1 章 本研究の背景と目的	1
1-1. 本研究の背景.....	2
(1) インスリンの主な生理作用	2
(2) 学習と記憶.....	3
(3) 実験動物（ヨーロッパモノアラガイ）について.....	4
(4) モノアラガイの味覚嫌悪学習.....	6
(5) インスリンと学習・記憶能力との関係.....	7
1-2. 本研究の目的.....	8
第 2 章 モノアラガイの味覚嫌悪学習の特徴.....	10
2-1. 序論.....	11
2-2. 材料と方法	11
(1) 実験動物	11
(2) CTA トレーニング.....	12
(3) 試薬の投与.....	13
(4) 統計処理	15
2-3. 実験結果	15
(1) CTA-LTM に対するアニソマイシンの影響	15
(2) CTA-LTM に対するアクチノマイシン D の影響.....	17
(3) CTA-LTM の消去の試み	18
(4) ISI の変化と CTA-LTM	19
2-4. 考察.....	21
第 3 章 インスリン投与による CNS タンパク質変化の網羅的解析.....	25
3-1. 序論.....	26
3-2. 実験方法	27
(1) 実験動物	27
(2) CNS へのインスリン投与.....	27

(3) タンパク質抽出	28
(4) タンパク質の蛍光標識	28
(5) 二次元電気泳動	29
(6) リン酸化プロテオーム	30
3-3. 実験結果	31
(1) 二次元電気泳動法による CNS タンパク質の比較	31
(2) リン酸化プロテオームによる変動ペプチドの解析	32
3-4. 考察	37
第 4 章 転写因子 FOXO と学習能力との関係	41
4-1. 序論	42
4-2. 実験方法	43
(1) 実験動物	43
(2) 絶食条件の定義	43
(3) RNA 抽出と cRNA の合成	43
(4) BLAST による mRNA 配列の同定	44
(5) PCR と 3'RACE 法による mRNA 配列の同定	45
(6) LymFOXO アミノ酸配列の同定と分子系統樹の作成	47
(7) Real-time PCR	48
(8) 免疫組織化学染色	51
(9) CTA トレーニング	52
(10) CNS へのインスリン投与	52
(11) 統計解析	52
4-3. 実験結果	52
(1) 推定した LymFOXO のアミノ酸配列	52
(2) CNS 内での LymFOXO mRNA の局在	56
(3) CNS 内での LymFOXO タンパク質の局在	56
(4) CTA による行動変化	57
(4) 様々な条件下での LymFOXO の CNS 内局在変化	58
(5) LymFOXO の局在変化に伴う下流遺伝子の発現量変化	62
4-4. 考察	66

第 5 章 総括	70
謝辞	75
参考文献	76

遺伝子名略称一覽

AKT : protein kinase B

APMAP : adipocyte plasma membrane-associated protein

CBP : CREB-binding protein

CREB : cAMP response element binding protein

eIF4B : eukaryotic initiation factor 4B

FOXO : forkhead box protein O

G6Pase : glucose 6-phosphatase

GABA : gamma-aminobutyric acid

GLUT4 : glucose transporter type 4

IGF-1 : insulin-like growth factor 1

IRS : insulin receptor substrate

MIP : molluscan insulin-related peptide

mTOR : mechanistic target of rapamycin

mTORC : mechanistic target of rapamycin complex

NCOA6 : nuclear receptor coactivator 6

NMDA : N-methyl-D-aspartic acid

PARN : poly(A)-specific ribonuclease

PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase-1

PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10

RICTOR : rapamycin-insensitive companion of mTOR

WDR44 : WD repeat-containing protein 44

その他略称一覧

5-HT : 5-hydroxytryptamine
ANOVA : analysis of variance
APS : ammonium peroxodisulfate
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSA : bovine serum albumin
BuG : buccal ganglia
CaCl₂ : calcium chloride (塩化カルシウム)
CeG : cerebral ganglia
CGC : cerebral giant cell
CNS : central nervous system
CS : conditioned stimulus
CTA : conditioned taste aversion
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMF : *N,N*-dimethylformamide
DNA : deoxyribonucleic acid
DTT : dithiothreitol
DW : distilled water
H₃PO₄ : phosphoric acid (リン酸)
HCl : hydrogen chloride (塩酸)
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ISI : interstimulus interval
ITM : intermediate-term memory
KCl : potassium chloride (塩化カリウム)
LGC : light green cell
LTM : long-term memory
MgCl₂ : magnesium chloride (塩化マグネシウム)
MS : mass spectrometry
NaCl : sodium chloride (塩化ナトリウム)
NaOH : sodium hydroxide (水酸化ナトリウム)
NCBI : National Center for Biotechnology Information

NEPHGE : nonequilibrium pH gel electrophoresis
ORF : open reading frame
PaG : parietal ganglia
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : phosphate-buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PeG : pedal ganglia
pI : isoelectric point
PIG : pleural ganglia
RACE : rapid amplification of cDNA ends
RNA : ribonucleic acid
SDS : sodium dodecyl sulfate
STM : short-term memory
TCA : trichloroacetic acid
TCEP : tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
TEMED : *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine
TSA : transcriptome shotgun assembly
US : unconditioned stimulus
VG : visceral ganglia

第 1 章

本研究の背景と目的

1-1. 本研究の背景

(1) インスリンの主な生理作用

インスリンは血糖濃度の恒常性維持に関わるペプチドホルモンの一種で、血中グルコースの細胞内への取り込みを促進させることによって血糖濃度を抑制する作用を有する。この作用は、PI3K/AKT 経路を介したグルコーストランスポーターの活性化により引き起こされる (Katagiri et al., 1996)。インスリンはまた、解糖の促進やグリコーゲン合成、タンパク質や脂質の合成促進といった代謝調節にも関与している。インスリンが PI3K/AKT 経路を活性化させることで、mTOR を介したタンパク質合成 (Laplante & Sabatini, 2009) や、転写因子 FOXO の阻害によるアポトーシス制御 (Link & Fernandez-Marcos, 2017) などに関与することが知られている。さらに近年では、インスリンが学習・記憶能力に関与しているという報告も上がっている。詳細については「1-1-(5) インスリンと学習・記憶能力との関係」で述べる。

インスリンは細胞膜上に存在するインスリン受容体と結合することで様々な生理活性を発現する。インスリン受容体はチロシンキナーゼ共役型受容体であり、インスリンが結合することで IRS などの基質タンパク質およびその下流のシグナル伝達分子がリン酸化され、カスケードが活性化される (Haeusler et al., 2018; Saltiel, 2021)。インスリン受容体は多くの生物に存在しており、その構造と機能は種を越えてよく保存されている。例えばヒトでは、肝臓や骨格筋、脂肪組織だけでなく、脳や赤血球などを含めたほとんどの組織で発現が確認されており、特に脳内では海馬や大脳皮質などの記憶形成に重要なニューロンなどで高い発現が見られる (Kleinridders et al., 2014)。中枢におけるインスリン受容体の役割として、摂食調節作用 (Schwartz et al., 1992; Baskin et al., 1999)、ニューロンの分化・増殖 (Heidenreich, 1993; Robinson et al., 1994)、神経保護作用 (King et al., 2015)、神経伝達物質の放出制御やシナプス可塑性 (Jonas et al., 1997; Wan et al., 1997; Chiu et al., 2008) への関与が示されている。インスリンシグナルと NMDA 受容体および GABA 受容体とのクロストークの存在も報告されている (Liu et al., 1995; Christie et al., 1999; Wan et al., 1997)。

(2) 学習と記憶

学習と記憶は動物の活動を支える基礎となる現象である。動物は新たな経験を通じて反応や行動を変化させることで、環境に応じた適切な反応や行動をとることができるようになる。学習とは、「経験によりもたらされる行動変化のプロセス」と説明される。学習に伴う動物の行動変化は、その動物に生来備わっている行動パターンや以前の学習によって獲得していた行動パターンの修正・変容により生じる。一方で、記憶とは、「学習によって得られた新たな情報を保持すること、また保持した記憶を取り出して再現すること」と説明される。記憶には、経験により得た新たな情報を記憶として取り込む「記銘

(encoding)」、記銘された情報を貯蔵する「保持 (retention)」、保持している情報を取り出して再現する「想起 (recall)」の3つのプロセスがあるとされている。こうした学習や記憶の形成メカニズムは、神経系における機能的あるいは構造的な変化、すなわち神経系の可塑性として捉えることができる。学習や記憶の形成過程では、シナプスの体積や受容体の量の変化に伴うシナプスの伝達効率の変化や、ニューロンが突起や側枝を出すことによる新たな神経回路の形成などが起こることが明らかになっている。

記憶は、情報が保持される期間、保持される情報の種類などにより、いくつかのタイプに分類することができる。情報が保持される期間に着目して分類した場合、短期記憶と長期記憶の2種類に大別される。この2つは保持時間の違いのみならず、記憶形成に至る分子メカニズムも異なっている。短期記憶

(short-term memory; STM) は、数秒から数時間程度保持される記憶のことを指す。保持時間だけでなく、一度に保持できる情報量にも限界があるとされる。STMの形成過程では、シナプス内に既に存在しているチャンネル分子やリソ酸化酵素の一過的な活性化により、シナプスの機能的な変化が起こるとされている。一方、長期記憶 (long-term memory; LTM) は、数時間から数週間以上、場合によっては半永久的に保持される記憶のことを指す。STMとは異なり、保持できる情報量に限界はないとされる。LTMの形成過程では、ニューロンにおける新規の遺伝子発現とそれに伴う新規タンパク質合成により、シナプスの数や形態などの構造的な変化が起こるとされている。

アメフラシやマウスなど様々な生物種において、学習直前に脳内へアニソマイシンなどのタンパク質合成阻害剤を投与すると、STMの形成には影響を及ぼさない一方でLTMの形成は阻害されるという報告がある (Davis & Squire,

1984; Castellucci et al., 1989; Abel et al., 1997)。このことから、学習した内容はまず不安定な状態である短期記憶として形成され、その後遺伝子発現や新規タンパク質合成による「固定化 (consolidation)」というプロセスを経ることで、安定した状態である長期記憶へと移行することが示唆されている。また、長期記憶は、想起に伴う不安定化と再固定化を繰り返すことによって強化されると考えられている (Nader et al., 2000)。再固定化は固定化と同様に新規タンパク質合成を必要とするが、その分子メカニズムは固定化とはやや異なることが示唆されている (Lee & Hynds, 2013)。

(3) 実験動物 (ヨーロッパモノアラガイ) について

本研究では、インスリンと学習・記憶能力との関係について研究するための実験動物として、淡水産巻貝の一種であるヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*; 以下モノアラガイ) を使用した (図 1-1)。モノアラガイの実験動物としての特徴を以下に示す。

1. 連合学習の習得及び保持が可能である。モノアラガイは、嗜好性の味覚刺激と忌避性の刺激を組み合わせる味覚嫌悪学習 (Nakai et al., 2020b)、光と回転運動を組み合わせる古典的条件づけ (Sakakibara et al., 1998) や空気呼吸行動へのオペラント条件づけ (Lukowiak et al., 2000) などを習得することができる。さらに、これらの記憶を LTM として保持することができる。こうした連合学習の習得および記憶形成に関わる分子基盤は、種を越えてよく保存されている。
2. 哺乳類と比較して単純な神経系をもつ。実験動物としては最も小型の哺乳類であるマウスでも脳内ニューロンの総数は約 10^7 個と考えられているのに対し、6 種類 11 個の神経節から構成されるモノアラガイの中枢神経系 (central nervous system; CNS) に含まれるニューロンの総数は約 10^5 個程度である (図 1-2)。また、学習・記憶に関わる多くの行動を媒介する神経回路がよく解明されており、味覚嫌悪学習の成立に関与するニューロンの同定も進んでいる (Benjamin, 2012)。
3. 血液脳関門が存在しない (Sattelle and Lane, 1972)。脊椎動物には血液脳関門という中枢と末梢の物質移動を制限する仕組みがある。例えば本研

究で着目したインスリンについては、末梢のインスリンはほとんど脳内に入ることができないため、インスリンが脳に及ぼす影響を捉えることが困難である。しかし、モノアラガイではこの仕組みが未発達であるため、インスリンが脳に及ぼす影響を容易に調べることができる。

その他にも、孵化後の餌の変更が必要ないことから研究室内での飼育が容易である、学習・記憶の成立に関与する神経回路の中で同定されているニューロンの多くが巨大であるため特定の細胞に着目しやすい、などといった特徴から、モノアラガイはインスリンと学習・記憶能力との関連を調べるのに適した実験動物であるといえる。



図 1-1. ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*)

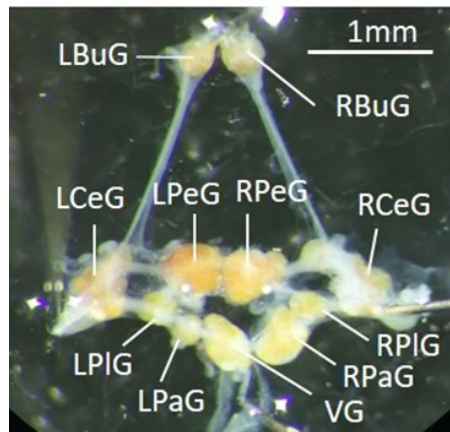


図 1-2. ヨーロッパモノアラガイの中枢神経系 (CNS)

BuG (buccal ganglia) : 口球神経節、CeG (cerebral ganglia) : 脳神経節、PeG (pedal ganglia) : 足神経節、PIG (pleural ganglia) : 側神経節、PaG (parietal ganglia) : 体壁神経節、VG (visceral ganglia) : 内臓神経節。VG 以外の神経節は左右一対ずつ存在する。

(4) モノアラガイの味覚嫌悪学習

味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion; CTA) は古典的条件づけの一種である。哺乳類では、特定の食物の味や色を条件刺激 (conditioned stimulus; CS)、内臓不快感を引き起こす処置を無条件刺激 (unconditioned stimulus; US) として組み合わせることで学習が成立し、CS に対して嫌悪感を示すようになる (Garcia & Koelling., 1966; Wilcoxon et al., 1971)。

モノアラガイの CTA においては、咀嚼行動を誘発するために嗜好性刺激である口元へのショ糖の提示を CS として用い、咀嚼行動を抑制するための忌避性刺激として US を提示する。忌避性刺激としては電気刺激、口元への塩化カリウム (KCl) の提示、頭部への接触などが用いられる。CS と US とを組刺激として一定回数繰り返し提示することで、CS の提示による咀嚼行動が抑制されるようになる。一度成立した CTA-LTM は 1 ヶ月以上に渡って保持される (Kojima et al., 1996)。

モノアラガイの CTA 形成に関する摂食回路の主要なニューロンについては同定が進んでおり、CeG に存在する cerebral giant cell (CGC) や、咀嚼行動のリズムを作る central pattern generator (CPG)、摂食中枢である BuG に存在する B1-B10 運動ニューロン、これらのニューロンをつなぐ介在ニューロン

である neuron 1 medial (N1M) 細胞 (Kojima et al., 1997) や neuron 3 tonic (N3t) 細胞 (Otsuka et al., 2013) などが知られている。

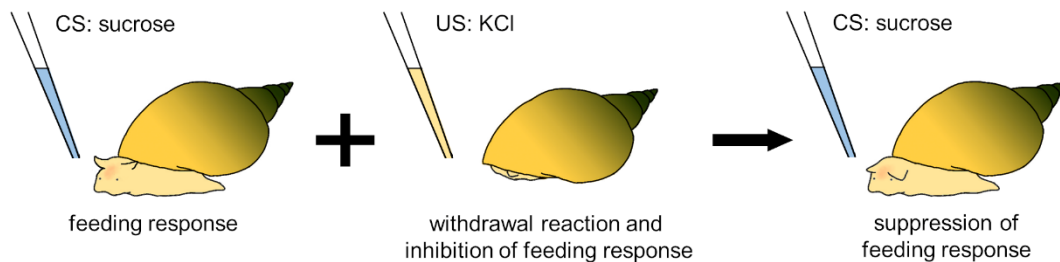


図 1-3. モノアラガイの味覚嫌悪学習

(Nakai et al. Insulin and Memory in Invertebrates. *Front Behav Neurosci.* 2022 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(5) インスリンと学習・記憶能力との関係

「1-1-(1) インスリンの主な生理作用」でも触れた通り、近年の研究で、インスリンが学習・記憶能力に深く関係していることが示唆されている。インスリン変異体のマウスでは STM や LTM の形成が阻害されることが報告されている。ヒトでは、インスリンと第 3 の糖尿病とも言われるアルツハイマー病との関連が示唆されている。臨床研究では、インスリンの経鼻投与がアルツハイマー病患者に信頼性の高い治療効果をもたらすことが明らかになっている (Wu et al., 2023)。

モノアラガイやショウジョウバエ、線虫といった無脊椎動物でも学習・記憶能力に関するインスリンの機能を評価する研究が多く行われている。なお、脊椎動物ではインスリンとインスリン様成長因子 IGF-1 が結合する受容体とその機能の違いにより区別されている (Siddle, 1992) のに対し、無脊椎動物ではインスリンと IGF-1 の区別はないと考えられる。理由としては、無脊椎動物ではインスリン様ペプチドのアイソフォームは数種類存在するのに対してインスリン/IGF-1 受容体が 1 種類しか存在しない (Nakai et al., 2022) ことや、インスリン/IGF-1 シグナル伝達が代謝、ストレス応答、寿命延長などに関与すること (Smit et al., 1988、Kenyon et al., 1993、Kenyon, 2010、Semaniuk et al., 2021)、モノアラガイのインスリンである軟体動物インスリン様ペプチド (molluscan insulin-related peptide; MIP) が成長制御に関与するとされる (Meester et al., 1992) 一方で血リンパ中グルコース濃度を低下させる役割を

持つことが挙げられる (Mita et al., 2014a)。

モノアラガイでは、MIP が味覚嫌悪学習に重要な役割を果たすことが知られている。MIP には MIP I, II, III, V, VII の 5 つのアイソフォームが存在するが、その中でも特に学習・記憶能力に関与しているとされる MIP II 遺伝子は、CNS 内に存在する成長制御性神経内分泌細胞である light green cell (LGC) での発現が確認されている (Smit et al., 1991)。MIP 受容体は 1 種類しか存在しないが、その遺伝子は CNS 内でユビキタスに発現している (Murakami et al., 2013)。cDNA マイクロアレイ法を用いた測定により、CTA 条件づけ直後のモノアラガイの CNS における mRNA 発現量を調べたところ、数種類の MIP の発現量が増加していることがわかっている。また、MIP II の mRNA 発現量を測定したところ、学習成績が「良い」モノアラガイの MIP II 発現レベルが、学習成績が「悪い」モノアラガイと比較して有意に高いということが明らかになっている (Azami et al., 2006)。さらに、単離した CNS への MIPs または哺乳類インスリンの投与は、CTA 学習および LTM 形成に重要な役割を果たすとされるニューロン間 (CGC と B1 運動ニューロン) でのシナプス結合の長期増強を引き起こすことがわかっている (Murakami et al., 2013)。インスリンが学習・記憶能力に及ぼす影響についての行動学的知見も得られており、インスリンシグナルの一過的な増強 (インスリンスパイク) が CTA 条件づけ後の LTM 想起のための最適な内部環境を誘導することが示唆されている (Mita et al., 2014a; Totani et al., 2020b)。

1-2. 本研究の目的

学習・記憶能力へのインスリンの関与は多くの生物種で報告が上がっているにも関わらず、インスリンと学習・記憶能力との間を結ぶ分子メカニズムについてはほとんど明らかとなっていない。こうした背景より、本研究では、インスリンと学習・記憶能力との間を結ぶ分子メカニズムを解明するため、モノアラガイの学習・記憶能力に関連する中枢神経系内インスリンシグナル伝達経路の分子機構を明らかにすることを目的とした。

本研究では、第 2 章でモノアラガイの味覚嫌悪学習の特徴を明らかにするための研究を行なった。第 2 章で明らかとなった内容をもとに、学習能力とインスリンとの関係を探るため、第 3 章でインスリン投与による CNS タンパク質

変化の網羅的解析を実施し、第4章でインスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO と学習との関係について調べた。最後に第5章にて全体の内容を統括した。

第2章

モノアラガイの味覚嫌悪学習の特徴

2-1. 序論

ヨーロッパモノアラガイの CTA は保持時間の長さから長期記憶に分類されている。「1-1-(2) 学習と記憶」で述べた通り、長期記憶の形成には新規タンパク質合成が必要であるが、モノアラガイの CTA が LTM に統合される過程のどの段階において新規タンパク質合成を必要としているのかについては明らかになっていない。

また、哺乳類の CTA についてはいくつかの特徴が知られている。例えば、CTA の記憶は頑強であり、消去させるためには複数回の CS の繰り返し提示が必要であること (Mickley et al., 2004)、また一度消去されたはずの記憶は時間経過により自発的に回復すること (Rosas and Bouton, 1996; Mickley et al., 2007) などが明らかになっている。さらに、通常の古典的条件づけでは CS-US 刺激間の間隔 (interstimulus interval; ISI) と条件反応の強さとの間に逆 U 字型の関数が見られるのに対し (Smith et al., 1969; Clark et al., 1994)、CTA では CS 提示後の US 提示が数時間遅延しても学習が可能である (Etscorn and Stephans, 1973)。しかし、モノアラガイの CTA においてもこれらの特徴が見られるのかについては不明である。

そこで本研究では、薬剤投与で転写または新規タンパク質合成を阻害することにより、モノアラガイの CTA が LTM として固定化される過程にタンパク質合成が必要であるのか、またタンパク質合成依存的な過程がどのタイミングで起こるのかについて調べた。さらに、モノアラガイの CTA の特徴を明らかにするために、CTA 条件づけ後に CS を繰り返し提示することによる CTA-LTM の消去の試みや、ISI を変化させることによる CTA-LTM への影響の検討をおこなった。

2-2. 材料と方法

(1) 実験動物

本研究では、実験室内の一般的な水槽で飼育されている、殻の長さ 20-25 mm のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を使用した。ヨーロッパモノアラガイの原種はオランダ・アムステルダム の Vrije Universiteit より入手

した。すべてのモノアラガイは 12 h/12 h の明暗サイクル条件下で、脱塩素フィルターを通した水温 20-23°C の水道水を用いて飼育した。餌として小松菜 (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) の葉を常時給餌した。

(2) CTA トレーニング

本研究では、トレーニング前に 24 時間絶食させた個体を用いた。これは先行研究により、軽度絶食させた個体群で最も優れた学習成績を示すことが明らかになっているからである (Mita et al., 2014)。本研究はモノアラガイを 1 匹ずつ透明な 35 mm プラスチックシャーレ内に入れて行った。咀嚼回数の計測は、モノアラガイをシャーレに入れた状態で透明な台の上に置き、シャーレの底を映すように設置した鏡を通して行った。

トレーニングを実施する前に、条件づけ前の CS に対する咀嚼反応を調べるために pretest を実施した。Pretest では、CS として 10 mM スクロース溶液 1 mL を 15 秒間口元に提示後、溶液を蒸留水 (DW) に入れ替え、1 分間の咀嚼回数 (口を開けた回数) をカウントした (図 2-1)。Pretest 時点で 1 分間の咀嚼回数が 10 回未満であった個体は、その後のトレーニングには使用しなかった。これは活動レベルが低い個体を実験から除外すると同時に、学習前後での咀嚼回数の変化の差を明確にするためである。

Pretest の後、10 分間の休憩を挟み、forward 条件付け (CS-US 組刺激) を、組刺激間の間隔を 10 分として計 10 回実施した。CS として 10 mM スクロース溶液 1 mL を 15 秒間提示した後、US として 10 mM KCl 溶液 1 mL を 15 秒間提示した。コントロール実験として、条件づけによる咀嚼行動の抑制が組刺激の順序特異的であることを示すために、刺激の提示順序を入れ替えた backward 条件づけ (US-CS 組刺激) を実施した。また、CS と US をそれぞれ DW に置き換えた naive 条件づけも実施した。

トレーニング後、CS に対する咀嚼行動の変化を調べるため、post-test を実施した。CS (10 mM スクロース溶液 1 mL) を 15 秒間口元に提示後、溶液を DW に入れ替え、1 分間の咀嚼回数を計測した。

一連のトレーニングは午前中に行った。これは午前中の方が学習内容を効果的に習得できるからである (Wagatsuma et al., 2004)。

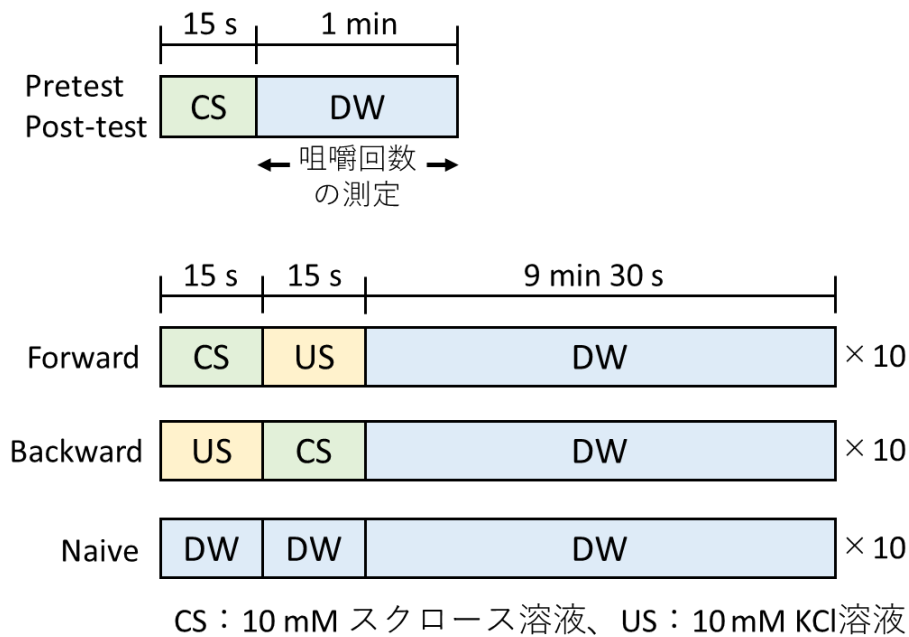


図 2-1. CTA トレーニングのプロトコル

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci.* 2020 より一部改変)

(3) 試薬の投与

アニソマイシンはリボソーム上のペプチジルトランスフェラーゼ反応を阻害することでタンパク質合成を阻害する。また、アクチノマイシンDはDNAに結合し、RNAポリメラーゼの動きを阻害することでRNA合成を阻害する (Alberts et al., 1994)。

先行研究により、アニソマイシンは軟体動物腹足類のタンパク質合成を効果的に阻害することがわかっている (Jacklet et al., 1980; Matsuo et al., 2002; Lyons et al., 2016)。また、モノアラガイにアニソマイシンとアクチノマイシンDを投与する際の有効濃度はどちらも 100 μ M が最適であるという報告がある (Fulton et al., 2005)。なお、Fulton らが実施した方法では、モノアラガイに 100 μ M 溶液を注入した際の薬剤の最終濃度は約 20 μ M であると推定されている。

本研究では、アニソマイシン (MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA) とアクチノマイシンD (MilliporeSigma) のそれぞれを *Lymnaea* 生理食塩水 (10

mM HEPES; pH 7.9、50 mM NaCl、1.6 mM KCl、2 mM MgCl₂、3.5 mM CaCl₂) に溶解して濃度 200 μM になるよう調製後、モノアラガイの腹腔内にシリンジを用いて 40 μL 注入した。殻長 20 mm のモノアラガイの推定血リンパ量は 400 μL であることから、体内のアニソマイシンとアクチノマイシン D の最終濃度はそれぞれ約 18 μM であると推定された。

試薬の投与は (i) トレーニング開始直前 (図 2-2A)、(ii) トレーニング中盤 (5 回目の組刺激終了後) (図 2-2B)、(iii) トレーニング終了直後 (図 2-2C)、(iv) トレーニング終了 1 時間後、(v) トレーニング終了 1 日後、(vi) トレーニング終了 1 週間後、に行った。

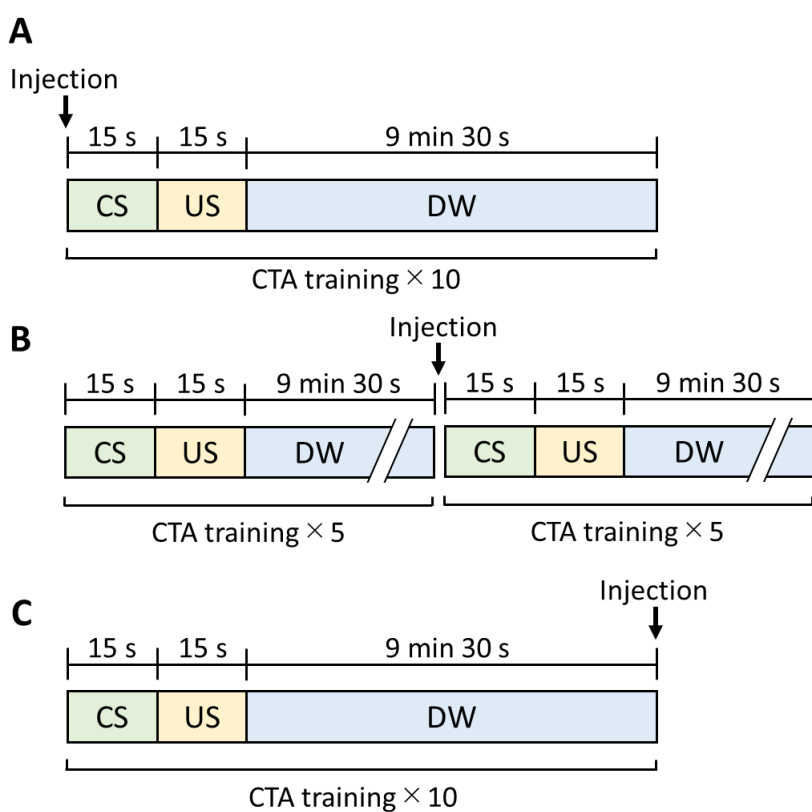


図 2-2. モノアラガイへの試薬投与のタイミング

(A) トレーニング前、(B) トレーニング中、(C) トレーニング後。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci.* 2020 より一部改変)

(4) 統計処理

データは平均値±標準誤差で表し、 $p<0.05$ で統計的に有意であるとみなした。対応のある2群間の比較解析には paired t test を、3群以上のデータの比較解析には two-way repeated measures ANOVA を用いた。 $post hoc$ test は Holm 法を使用した。統計解析ソフトは R (version 3.5.1; <https://www.r-project.org/>) を使用した。

2-3. 実験結果

(1) CTA-LTM に対するアニソマイシンの影響

モノアラガイの CTA トレーニング前後の特定のタイミングでアニソマイシンを投与し、CTA-LTM に与えるタンパク質合成阻害の影響を調べた (図 2-3)。アニソマイシンの投与前後での咀嚼回数には有意な差は見られなかった ($n=12$ 、図 2-3A)。よって、アニソマイシンの投与そのものが咀嚼回数を抑制させるという可能性は否定された。

CTA トレーニング前にアニソマイシンを投与すると、post-test では CS に対する咀嚼反応が弱く抑制された ($n=10$ 、図 2-3B)。Forward 群では backward 群や naive 群と比較して post-test における咀嚼回数は抑制されたが、図 2-3d~g で見られるような強い抑制は見られなかった。

CTA トレーニング中にアニソマイシンを投与した群では、CTA-LTM は観察されなかった ($n=10$ 、図 2-3C)。このことから、CTA トレーニング中に新規タンパク質合成を阻害すると LTM への固定化が阻害されることが明らかとなった。つまり、CTA の LTM への固定化は CTA トレーニング中に起こっていると考えられる。

一方、CTA トレーニング直後にアニソマイシンを投与した群では、CTA-LTM の形成阻害は見られなかった ($n=10$ 、図 2-3D)。同様に、CTA トレーニングの1時間後、1日後、1週間後にアニソマイシンを投与した群では、forward 群の摂食回数は pretest と比較して有意に減少しており、アニソマイシンによる翻訳阻害作用は見られなかった ($n=10$ each、図 2-3E~G)。これらの結果は、CTA トレーニングが終了する前に LTM への統合が完了すること、また LTM の想起に新規タンパク質合成が必須ではないことを示している。

なお、アニソマイシンの投与タイミングに関わらず、backward 群と naive 群ではトレーニングによる咀嚼反応の抑制は見られなかった。

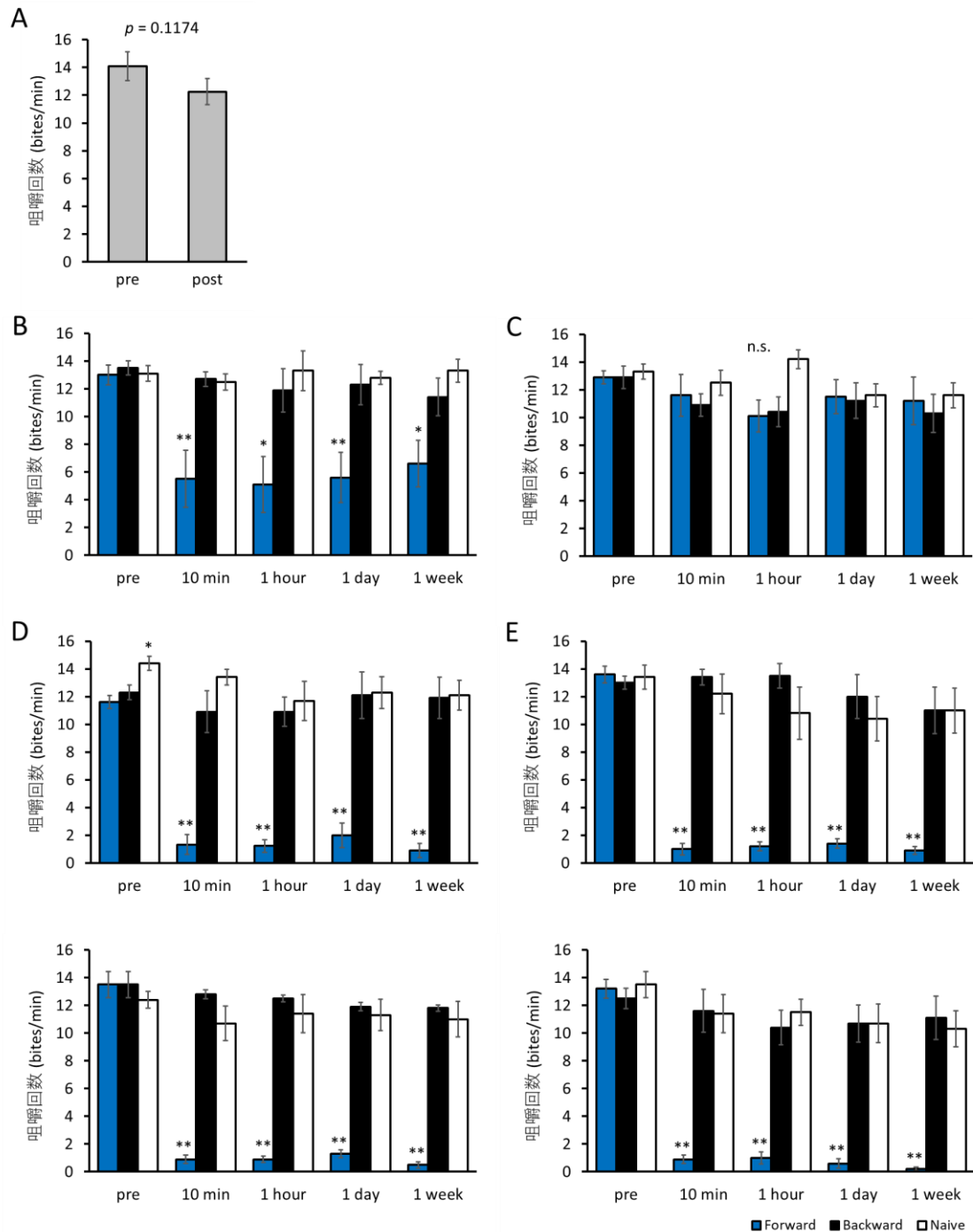


図 2-3. アニソマイシン投与による CS に対する咀嚼反応の変化

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$ 。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci.* 2020 より一部改変)

(2) CTA-LTM に対するアクチノマイシン D の影響

CTA-LTM に対するタンパク質合成阻害の影響をさらに調べるため、アクチノマイシン D を用いて、CTA-LTM に与える転写阻害の影響を調べた (図 2-4)。アクチノマイシン D を投与した前後での咀嚼回数には有意な差は見られなかった (n=10、図 2-4A)。よって、アクチノマイシン D の投与そのものが咀嚼回数を抑制させるという可能性は否定された。

CTA トレーニング前にアクチノマイシン D を投与すると、post-test での CS に対する咀嚼反応の抑制があまり起こらなかった (n=10、図 2-4B)。

アニソマイシンでの実験と同様に、CTA トレーニング中にアクチノマイシン D を投与した群では、CTA-LTM は観察されなかった (n=10、図 2-4C)。このことから、CTA トレーニング中に遺伝子発現が起こり、LTM への統合につながることを示された。

一方、CTA トレーニング直後にアクチノマイシン D を投与した群では、咀嚼反応の有意な抑制が観察された (n=10、図 D)。この結果はアニソマイシンでの実験と同様に、CTA トレーニング終了前に LTM への統合が完了することを裏付けている。

なお、アクチノマイシン D の投与タイミングに関わらず、backward 群と naive 群ではトレーニング後の咀嚼反応の抑制は見られなかった。

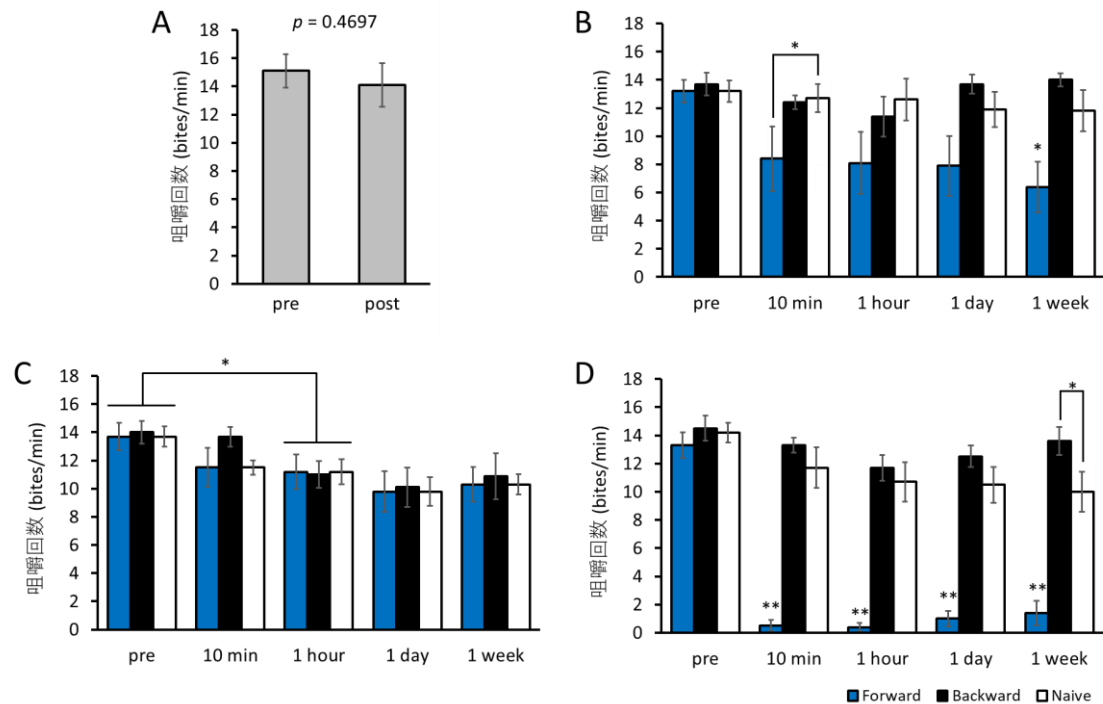


図 2-4. アクチノマイシン D 投与による CS に対する咀嚼反応の変化

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$ 。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci*. 2020 より一部改変)

(3) CTA-LTM の消去の試み

次に、CTA-LTM を消去するため、CTA トレーニング後のモノアラガイに CS のみを数回提示した。CTA トレーニング終了から 10 分後、1 時間後、2 時間後、3 時間後、4 時間後の計 5 回に渡って CS のみを提示し (図 2-5A)、その 1 日後および 1 週間後に CTA-LTM による咀嚼行動の変化を評価した (図 2-5B)。CTA トレーニング前の pretest では、forward 群、backward 群、naive 群の 3 群間で咀嚼回数に有意な差は見られなかった。しかし、CTA トレーニングと CS のみの提示を行なった 1 日後と 1 週間後の post-test では、forward 群のみ咀嚼行動が有意に抑制されたままであった (n=10)。Forward 群において CS の繰り返し提示による咀嚼行動抑制の消去、すなわち咀嚼回数の増加が見られなかったことから、モノアラガイの CTA-LTM は哺乳類の CTA-LTM と同様に頑強であることが示された。

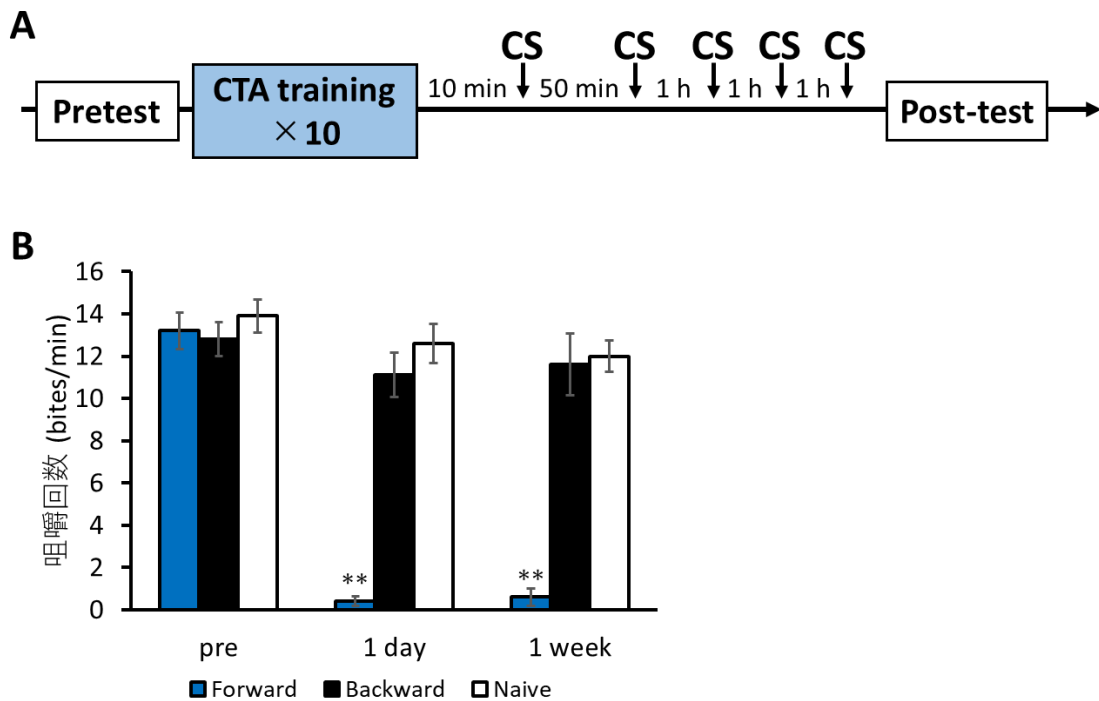


図 2-5. CTA-LTM 消去の試み

(A) CTA トレーニング後の CS 提示のタイミング、(B) 咀嚼回数の変化。

** : $p < 0.01$ 。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci*. 2020 より一部改変)

(4) ISI の変化と CTA-LTM

モノアラガイの CTA において、CS 提示開始と US 提示開始の間隔、すなわち ISI の最適なタイミングが観察されることを期待して研究を実施した。

ISI を独立変数として変化させ、行動変化、すなわち咀嚼反応の抑制の強さを従属変数として評価した (図 2-6、2-7)。本研究では、6 通りの ISI (0 秒、10 秒、15 秒、1 分、3 分、5 分) について評価した。0 秒の ISI では、CS と US を同時に提示した。通常の CTA トレーニングのプロトコルは 15 秒の ISI である。組刺激間の間隔は 10 分なので、5 分の ISI では、モノアラガイには CS-US 組刺激と US-CS 組刺激の区別がつかなくなる。

0 秒の ISI、すなわち CS と US を同時に提示した場合には、CTA の獲得は起こらなかった。この条件では、モノアラガイは提示した CS+US 刺激に対して

引き込み反応を示した。ISI を 10 秒にすると、CTA トレーニング後の咀嚼回数は、backward 群や naive 群の咀嚼回数に比べて有意に抑制され、CTA-LTM が完全に形成されたことが示された。通常の CTA トレーニングで用いられる 15 秒の ISI に加え、ISI が 1 分や 3 分の場合でも、CTA トレーニング後に咀嚼行動は抑制された。これらの結果より、US 提示が CS 提示より 3 分遅れた場合でも、CTA-LTM が形成されることがわかった。

ISI を 5 分に設定した場合、forward 群、backward 群、naive 群の 3 群の咀嚼回数に有意な差は見られなかった。これは、モノアラガイが CS と US との関連づけができなかったためであると考えられた。

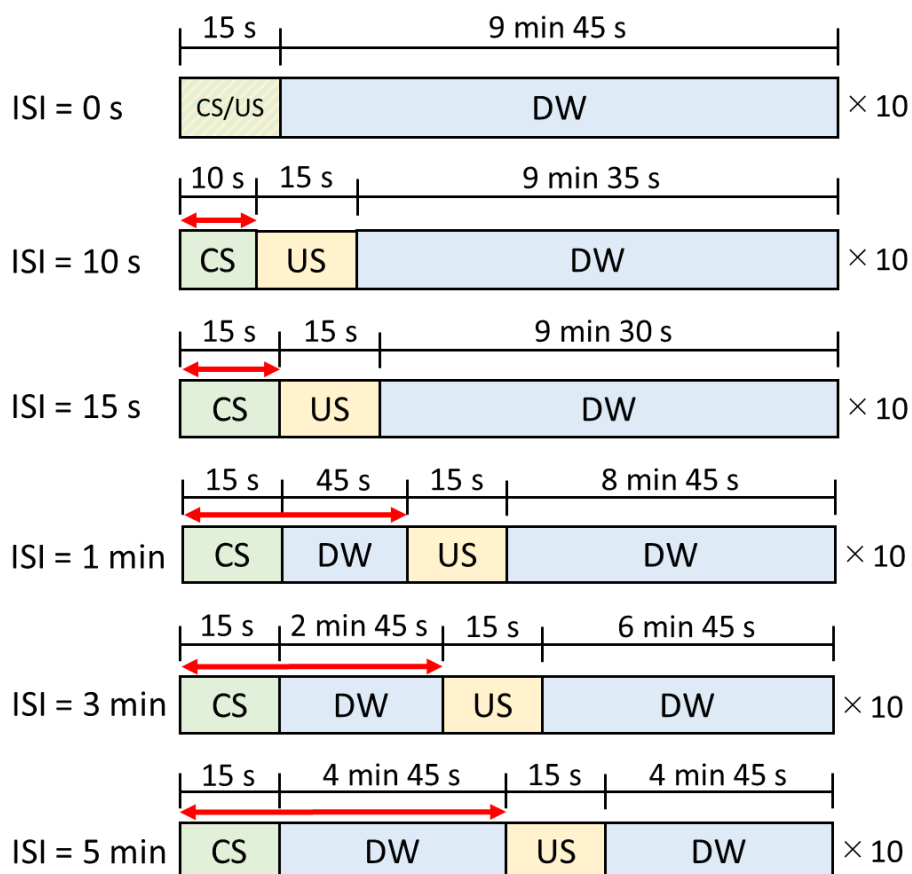


図 2-6. CTA トレーニングにおける ISI を変更したプロトコル

赤い矢印は ISI を示している。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci.* 2020 より一部改変)

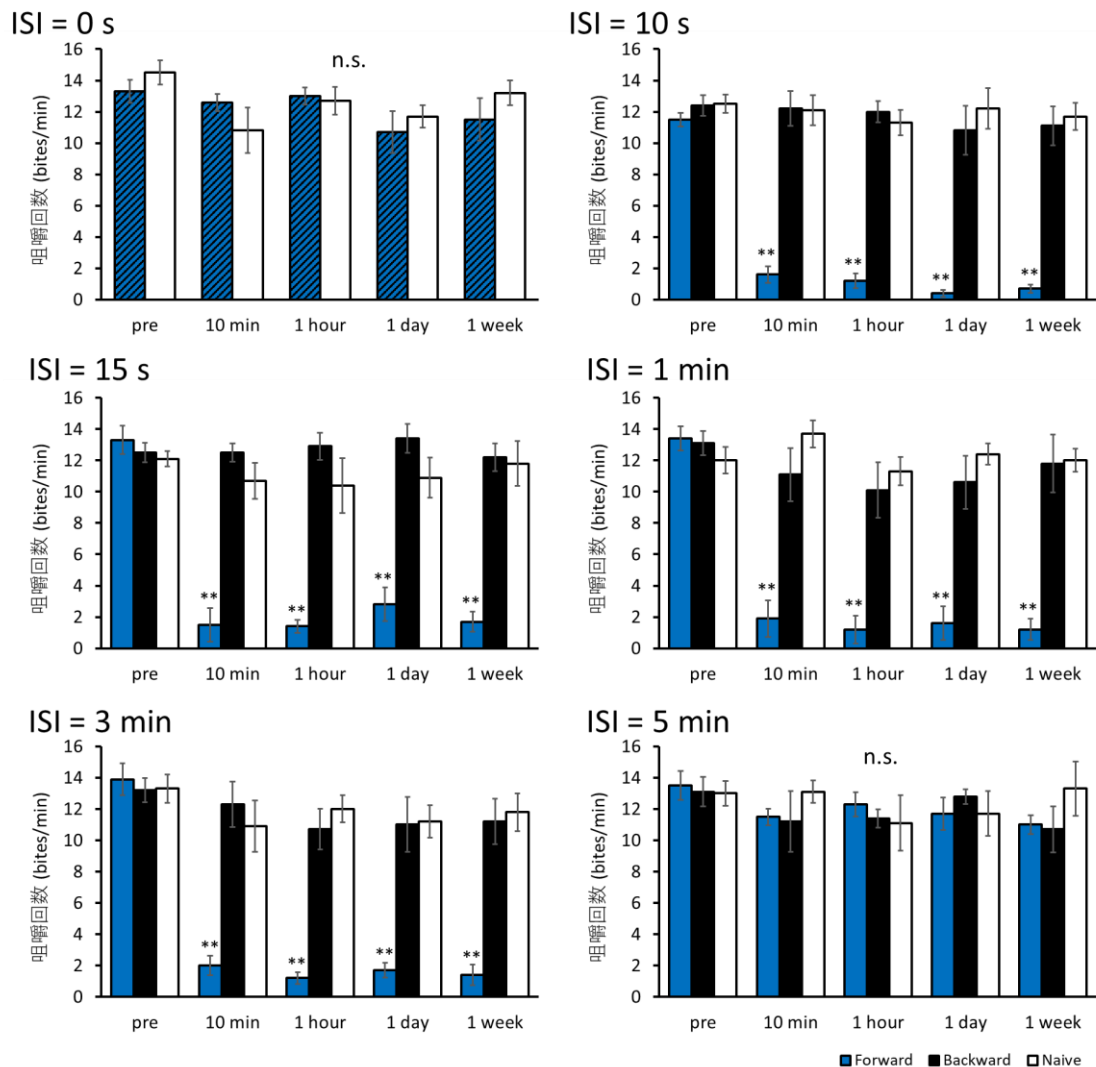


図 2-7. ISI の変化に伴う、CS に対する咀嚼反応の変化

n.s.: $p > 0.05$, ** : $p < 0.01$ 。

(Nakai et al. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci.* 2020 より一部改変)

2-4. 考察

本研究の結果より、モノアラガイの CTA が新規 mRNA 合成依存的な過程と新規タンパク質合成依存的な過程を経て LTM に統合されることが示された。また、CTA トレーニング中の転写・翻訳阻害剤の投与により LTM の固定化が有意に阻害された一方、トレーニング後の阻害剤投与は LTM の固定化にはほとんど影響しなかった。新規タンパク質合成に対するアニソマイシンの効果は

少なくとも投与後 3 時間は持続すること (Fulton et al., 2005) や 10 回の CTA トレーニングにかかる時間は約 2 時間であることを考慮すると、CTA-LTM の統合は 10 回の CTA トレーニング中に始まり、CTA トレーニング中に完了すると言える。転写・翻訳阻害と記憶形成の経時的な変化との関係にはいくつかの先行研究がある。「1-1-(2) 学習・記憶」でも述べた通り、記憶は保持時間に応じて短期記憶と長期記憶の 2 つに大別される。しかし近年、短期記憶と長期記憶の間に、中期記憶 (intermediate-term memory; ITM) が存在することが報告されている (Rosenzweig et al., 1993)。ITM は LTM と同様にタンパク質合成を必要とするが、転写は必要とせず、既存の mRNA からの翻訳が重要であることが示唆されている (Sutton et al., 2001)。また、モノアラガイの ITM は LTM より早く形成される (Sangha et al., 2003a)。本研究の結果では、記憶形成に mRNA 合成とタンパク質合成の両方を必要とすることから、モノアラガイの CTA は LTM であることを生理学的に証明することができた。

先行研究で、1 回の CS-US 対提示によってモノアラガイの 40% で CTA が形成され、10 回の CS-US 対提示によってほぼすべてのモノアラガイで CTA が形成されることが証明されている (Sugai et al., 2007)。同じ条件下で飼育しているにも関わらずモノアラガイの学習能力には個体差があり、学習速度も個体によって異なる。CTA をより早く獲得する個体がいることは、図 2-2b や図 2-3b において咀嚼回数の抑制が弱く起こったことの説明になると考えられる。つまり、1 回の CS-US 対提示によって CTA を形成できる個体が、CTA トレーニング前の転写・翻訳阻害剤投与による阻害の影響を受けたことで、全体として弱い咀嚼回数抑制が起こったように見えたのではないかと推測される。

また今回の結果からは、転写および翻訳阻害はモノアラガイにおいて CTA の想起を阻害しないことも明らかになった。これは、1 回の CS-US 組刺激提示の 10 分後に転写・翻訳阻害剤を投与すると CTA の形成が阻害された一方、CS-US 組刺激提示の 1 時間後以降の阻害剤投与による LTM の固定化及び想起への影響はなかったとする Fulton らによる報告と一致する (Fulton et al., 2005)。しかし他の生物を用いた先行研究では、長期記憶形成におけるタンパク質合成依存的な過程には学習トレーニングの直後とその数時間後という 2 つの段階があることが報告されている (Freeman et al., 1995; Bourtchouladze et

al., 1998; Epstein et al., 2003)。さらに、ラットの恐怖条件づけで固定化された記憶を想起する際にタンパク質合成を阻害すると記憶が消失するという報告もある (Neder et al., 2020)。これらを踏まえると、モノアラガイの CTA-LTM 形成にはタンパク質合成依存的な過程の第 2 段階が必要ではないもしくは存在しないこと、また CTA-LTM の想起にタンパク質合成依存的な過程が必要ではないもしくは存在しないことが示唆される。

CTA-LTM の消去の試みについて、CS の繰り返し提示による LTM の消去は見られなかったことから、CTA-LTM が頑強であることが示された。Sangha らが実施したモノアラガイの呼吸行動のオペラント条件づけの消去実験 (Sangha et al., 2003b) では、記憶の消去に新規 mRNA 合成および新規タンパク質合成が必要であるという証拠から、消去は「新しい連合記憶」であり、新しい記憶によって「古い」記憶が覆い隠されるが、古い記憶そのものが消失するわけではないと結論づけた。消去学習は哺乳類の恐怖条件づけでよく研究されているが、消去学習成立後も様々な刺激 (一定期間経過後の再度の CS 提示など) によって恐怖反応が回復することから、元の記憶そのものは保存されていることが示されている (Myers & Davis, 2007)。これらのことから、モノアラガイの CTA の消去が見られなかった理由として、消去学習は成立したものの 1 日以内に「古い」記憶が回復したという説は否定できない。この点については、今後 CTA 消去学習の実施後 1 日以内に着目した研究による実証が必要となるだろう。

本研究では、CTA-LTM は 10 秒から 3 分の ISI で形成された。CS 提示と US 提示の間の遅延時間と条件反応の強さは通常逆 U 字型を示すとされる。しかし今回の結果からは、CTA が形成された群では ISI に関わらず咀嚼行動の強い抑制が見られた。つまり、一般的な連合学習には学習が習得可能な 2 つの刺激間の最適な時間というものが存在するが、CTA は 2 つの刺激間の時間が離れていても一定の学習が成立する、すなわち遅延学習が可能であるということを示すことができた。

今回の結果より、モノアラガイの CTA に関していくつかの行動学的知見を得ることができた。モノアラガイの CTA の特徴を哺乳類の CTA の特徴と比較

すると以下のようにまとめられる。第 1 に、哺乳類の CTA では CS が内臓不快感を伴う US（放射線照射や塩化リチウム投与など）と対提示されることで学習が成立する。モノアラガイを含めた無脊椎動物の CTA においてもこのような刺激が US として用いられるが、哺乳類とは異なり吐き気などの行動は容易に観察できない。第 2 に、CTA-LTM は哺乳類においてもモノアラガイにおいても 1 回の CS-US 対提示で十分に形成される。ただし、モノアラガイにおいては、1 回の対提示で学習が成立するのは全体の約 40%である (Sugai et al., 2007)。第 3 に、モノアラガイの CTA は哺乳類の CTA と同様に頑強性を示す。第 4 に、哺乳類では US 提示が数時間遅延しても CTA が成立する (Etscorn and Stephans, 1973)。モノアラガイを用いた本研究では US 提示の遅延時間は最大 3 分とそれほど長くはなかったが、CTA の効果は一定期間にわたって一定であった。これらの特徴により、モノアラガイを用いて CTA を研究することは、哺乳類の CTA に対する知見を補完するものであるといえる。

本章では、モノアラガイの CTA-LTM に新規タンパク質合成が必要であることを証明した。ここで、モノアラガイの学習能力を向上させる要因の 1 つであるインスリンに着目し、インスリンが新規タンパク質合成を促進することで学習能力の向上につながるのではないかと仮定した。そこで続く第 3 章では、学習・記憶能力に関連するインスリンシグナル伝達経路の解明に向けた第一歩として、モノアラガイの CNS 内インスリンシグナル伝達経路の網羅的解析を行った。

第 3 章

インスリン投与による CNS タンパク質変化の 網羅的解析

3-1. 序論

「1-1-(5) インスリンと学習・記憶能力との関係」で述べたように、いくつかの先行研究によりモノアラガイの学習・記憶能力にインスリンが関連していることがわかっている。学習・記憶能力とインスリンとの関連はモノアラガイのみならず、線虫やショウジョウバエ、マウスやヒトでも報告されている。線虫を用いた研究では、インスリン/IGF-1 シグナル伝達経路に含まれる分子である *daf-2* (インスリン受容体ホモログ)、*age-1* (PI3K ホモログ)、*akt-1* (AKT ホモログ) *pdk-1* (PDK1 ホモログ)、*daf-16* (FOXO ホモログ) の変異体で学習能力が低下する一方でインスリン/IGF-1 シグナルを負に制御する *daf-18* (PTEN ホモログ) 変異体では学習能力が向上することを明らかにしたが (Tomioaka et al., 2006; Vellai et al., 2006)、その機能についての詳細は不明である。マウスやヒトなどの哺乳類を用いた研究では、主にアルツハイマー病の治療としてのインスリンの有効性に焦点を当てているが、具体的な分子経路に関する研究は乏しい。このように、学習・記憶能力とインスリンとの関連に関する知見の多くは行動学的な実験に基づくものであり、学習・記憶能力に関連するインスリン受容体下流の分子とその機能についてはほとんど明らかとなっていない。

そこで、この分子メカニズムを解明するにあたって、LTM の形成に必要な新規タンパク質合成を促進するためには転写因子の活性化が重要であると考えた。加えて、これまでに知られている学習・記憶能力に関連する分子や、インスリンシグナル伝達関連分子をもとに、学習・記憶能力に関連するインスリンシグナル伝達経路を推測した (図 3-1)。例えば、AKT/mTOR シグナル伝達経路を介した GLUT4 の制御、AKT/mTOR シグナル伝達経路下流にあると考えられる転写因子 CREB や転写因子 FOXO の制御、mTOR の活性化による細胞骨格の変化や新規タンパク質合成などが起こるといふ仮説を立てた。

本研究では、モノアラガイにおけるインスリンシグナル伝達経路の下流タンパク質を解明し、CTA などの学習に関与する因子を発見することを目的として研究を実施した。二次元電気泳動法とリン酸化プロテオーム解析を用いて、インスリン投与によるモノアラガイの CNS タンパク質のリン酸化レベルの変化を網羅的に解析した。

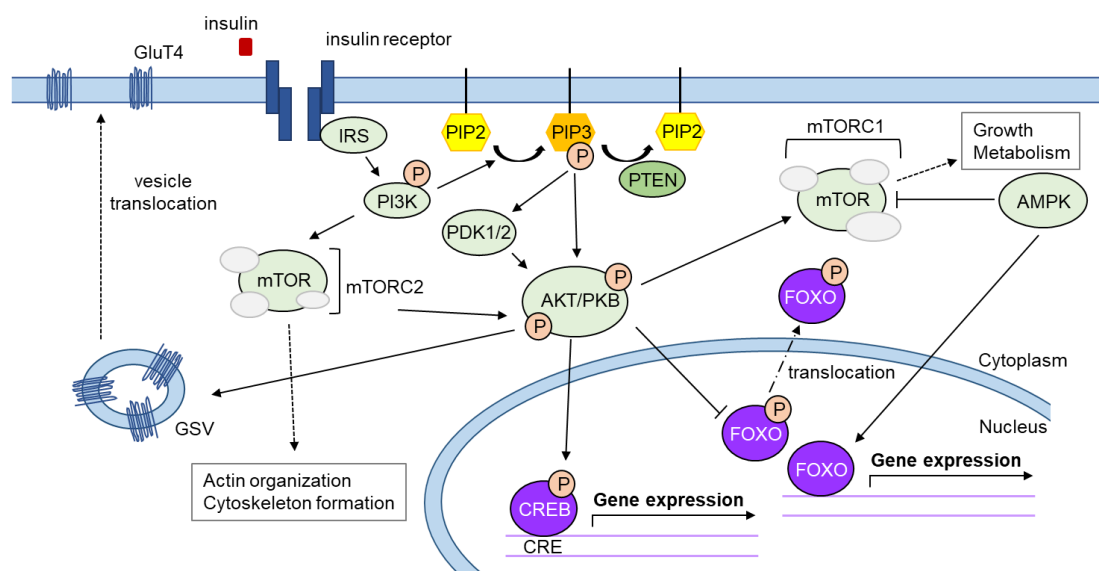


図 3-1. 学習・記憶能力に関連するインスリンシグナル伝達経路の予想

(Totani et al. Memory-enhancing effects of short-term fasting. *Eur. Zoolog. J.* 2020 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

3-2. 実験方法

(1) 実験動物

2-2-(1) に記載した方法に従った。

(2) CNS へのインスリン投与

冷 *Lymnaea* 生理食塩水中でモノアラガイを解剖し、CNS を単離した。単離した CNS を、*Lymnaea* 生理食塩水で 100 nM に調製したウシ由来インスリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に室温 60 分間浸漬した。コントロールとして溶媒である 120 nM HCl を用いた (=vehicle control)。

MIP の精製が困難であるため、本研究では MIP の代わりとしてウシ由来インスリンを用いた。ウシ由来インスリンがモノアラガイに対して有効であることは以下のように実証されている。

1. モノアラガイ MIP 受容体の結合部位は種を超えて保存されている。モノアラガイの MIP 受容体 (Accession no. CAA59353) とヒトのインスリン受容体 (Accession no. AAA59174)、マウスのインスリン受容体

(Accession no. AAA39318) のアミノ酸配列を比較すると、L1 ドメインは 56%、L2 ドメインは 33%の相同性を示す。

2. 軟体動物である *Aplysia californica* を用いた先行研究では、ウシ由来インスリンを投与するとインスリン受容体にあるチロシン残基の自己リン酸化が刺激されることで活性化し (Jonas et al., 1996)、産卵ホルモンの放出を誘発することが示されている (Jonas et al., 1997)。
3. モノアラガイを用いた先行研究で、MIP またはウシ由来インスリンを投与した電気生理学的実験の結果、どちらもモノアラガイ CNS の特定のシナプスにおいて長期増強を引き起こすことが示されている (Murakami et al., 2013)。また別の先行研究では、モノアラガイへの MIP またはウシ由来インスリンの投与により、血リンパ中のグルコース濃度が低下することがわかっている (Totani et al., 2020b)。

(3) タンパク質抽出

モノアラガイから単離した CNS を、溶解バッファー (9.2 M 尿素、1% Triton-X 100、2% Bio-Lyte、30 mM Tris-HCl; pH 8.0) 中でソニケーターを用いて超音波処理した。CNS 溶解液を 15,000×g で 7 分間遠心した後、上清を回収し、Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。

なお、Bio-Lyte は Bio-Lyte 3/10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) と Bio-Lyte 4/6 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を 3 : 7 の割合で混合したものを使用した。以下、「Bio-Lyte」と記載されているものは全て本混合液のことを指す。

(4) タンパク質の蛍光標識

CyDye DIGE Fluor Saturation Dye (GE Healthcare Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってタンパク質を蛍光標識した。

タンパク質 2.5 μg が含まれた溶液に 2mM TCEP (Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を加え、37°C で 60 分間インキュベートした。蛍光標識は、TCEP 処理後の溶液に DMF に溶解させた 2 mM Cy3 または Cy5 saturation dye を加え、37°C で 30 分間インキュベートすることにより行った。Cy3 および Cy5 で標識

したタンパク質を表 2-1 に示す。標識反応は、15%グリセロール、130 mM DTT、2%Bio-Lyte からなるバッファーを添加することで終了させた。標識処理はすべて遮光条件下で実施した。

表 2-1. 蛍光標識の実験デザイン

Gel	Cy3	Cy5
1	Pooled standard	Insulin 1
2	Pooled standard	Insulin 2
3	Pooled standard	Insulin 3
4	Pooled standard	HCl 1
5	Pooled standard	HCl 2
6	Pooled standard	HCl 3

Pooled standard は、実験に使用した全てのタンパク質試料を等量混合したものである。

(5) 二次元電気泳動

一次元目は非平衡 pH ゲル電気泳動法 (nonequilibrium pH gel electrophoresis; NEPHGE) による等電点での分離を行なった。8 M 尿素、4% アクリルアミド、2% Bio-Lyte を混合して蒸留水で 1 mL にメスアップし、尿素が完全に溶解してから 0.05%APS、0.1%TEMED) を加えてゲル溶液を作成した。ゲル溶液を、マイクロピペットを用いて 100 μ L キャピラリーガラス (Drummond, Broomall, PA, USA) に約 90 μ L 吸い上げ、固まるまで静置した。3-2-(4) に記載した方法で標識処理した Cy3 および Cy5 標識タンパク質を 2.5 μ g ずつ混合し、細いキャピラリーガラスを用いてゲル上に添加した。泳動バッファーは、上部バッファーとして 10 mM H_3PO_4 、下部バッファーとして 20 mM NaOH を使用した。また、ゲル泳動装置の電極は、上部に陽極、下部に陰極が来るようにセットした。400 V で 4 時間泳動後、シリンジを用いてゲルを毛細管から押し出し、蒸留水で数回洗浄した。

泳動後のキャピラリーゲルを TCA (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に 10 分間浸漬し、ゲル中のタンパク質を固定した。タンパク質固定後のゲルを蒸留

水に入れ、数回水を換えながら計 30 分間振盪し、ゲル内の TCA や両性担体を洗い流した。洗浄後のゲルを SDS 平衡化液 (2.3%SDS、1% DTT、10%グリセロールを 1.5 M Tris-HCl; pH 8.8 で 10 mL にメスアップ) に入れ、室温で 15 分間振盪した。

二次元目は SDS-PAGE による分子量での分離を行なった。SDS-PAGE ゲルは、ミニスラブゲル用プレート (9×8 cm、1mm 厚) に 12%分離ゲル (12% アクリルアミド、375 mM Tris-HCl; pH 8.8, 0.2% SDS, 0.072% APS, 0.08% TEMED) と 5%濃縮ゲル (5%アクリルアミド、120 mM Tris-HCl; pH 6.8, 0.2% SDS, 0.072% APS, 0.08% TEMED) を注入して作製した。泳動バッファは Tris-Glycine バッファ (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS) を用いた。SDS 平衡化をおこなったキャピラリーゲルを SDS-PAGE ゲルの上に乗せ、150 V で 1.5 時間泳動した。

泳動後のゲルは ChemiDoc MP Imaging System (Bio-lad) で撮影した。撮影したデータの解析は目視で行った。

(6) リン酸化プロテオーム

3-2-(2) に記載した方法に従ってインスリン投与 CNS と HCl 投与 (コントロール) CNS を作成し (n=3 each)、タンパク質のペプチド断片化処理とリン酸化ペプチドの濃縮および nanoLC-MS/MS 分析を行った (かずさ DNA 研究所に外部委託)。MS 分析により、プロテインライブラリ作成用 MS データと比較定量解析用 MS データを得た。

Wooller らが作成した *Lymnaea* プロテインライブラリ (Wooller et al., 2022) のデータから、プロテインライブラリ作成用 MS データと Proteome Discoverer v2.3 を用いてリン酸化ペプチドライブラリを作成した。このライブラリを用いて、Scaffold DIA で比較定量解析用 MS データを解析することで、リン酸化ペプチドの同定ならびに定量値 (MS/MS のピーク面積から求めたリン酸化ペプチドの相対量) を算出した。

インスリン投与群と HCl 投与 (コントロール) 群のリン酸化ペプチドの定量値を比較して fold-change を求めた。2 群間の有意差は、R (version 4.2.1; <https://www.r-project.org/>) を用いて Welch's *t*-test により算出した。

3-3. 実験結果

(1) 二次元電気泳動法による CNS タンパク質の比較

インスリン投与による CNS タンパク質の発現量変化とリン酸化の変化を調べるために、二次元電気泳動を行った (図 3-2)。インスリン投与群と HCl 投与 (コントロール) 群で比較したところ、スポットの数と位置の両方でいくつかの違いが観察された。タンパク質のリン酸化によると考えられる酸性側へのスポット位置のシフトが観察された (図 3-1C (a) (b))。さらに、インスリン投与による発現量の変化と考えられるスポットサイズの違いも観察された (図 3-1C (c))。しかし、各スポットのタンパク質量は MS 解析に用いるには少なすぎることや、また、モノアラガイのプロテインデータベースが存在しなかったことから、スポットのタンパク質の同定には至らなかった。

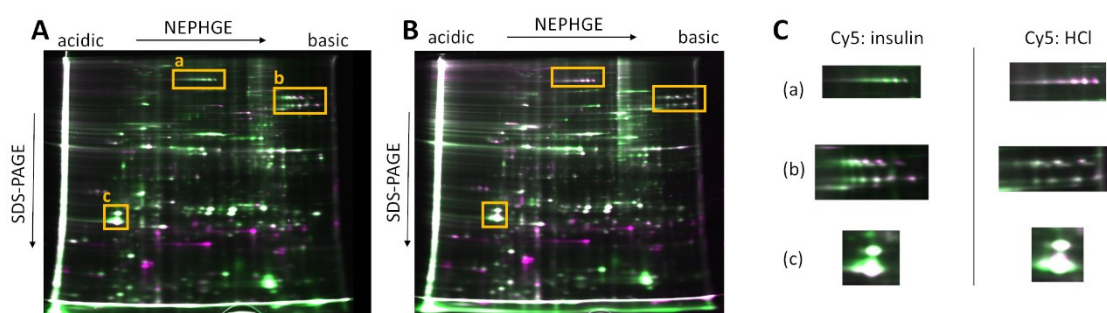


図 3-2. 二次元電気泳動の結果

(A) インスリン投与サンプルを Cy5 saturation dye で標識し、pooled standard を Cy3 saturation dye で標識した。Cy3 標識タンパク質はマゼンタ色、Cy5 標識タンパク質は緑色で示す。(B) HCl 投与 (コントロール) サンプルを Cy5 saturation dye で標識し、pooled standard を Cy3 saturation dye で標識した。(C) (A) と (B) の枠で囲んだ部分を拡大。

(Nakai et al. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophys Physicobiol.* 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(2) リン酸化プロテオームによる変動ペプチドの解析

リン酸化プロテオーム解析は、Wooller らが作成した *Lymnaea* プロテインライブラリを用いて行った (Wooller et al., 2022)。プロテインライブラリから得られた合計 9627 個のリン酸化ペプチドについて比較定量解析を行い、比較結果をボルケーノプロットで示した (図 3-3)。ボルケーノプロットが示すように、 $p < 0.05$ で定量値に有意差の見られたリン酸化ペプチドは 806 個あった。その中で、インスリン投与後にリン酸化タンパク質の定量値に 2 倍以上の増加が見られた 17 個のリン酸化ペプチド (12 個のタンパク質由来) と、1/2 倍以下の減少が見られた 18 個の脱リン酸化ペプチド (17 個のタンパク質由来) に注目した。2 倍以上の増減が見られたリン酸化ペプチドについて、定量値をヒートマップとして表した (図 3-4)。また、リン酸化ペプチドのタンパク質名を同定し、一覧にした (表 3-2、3-3)。タンパク質名は、protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) を用いて、*Lymnaea* プロテインライブラリ内の配列を検索することにより同定した。特に、*Lymnaea* プロテインライブラリに全長 ORF を含む配列が登録されているタンパク質については、併せて分子質量と pI を記載した。

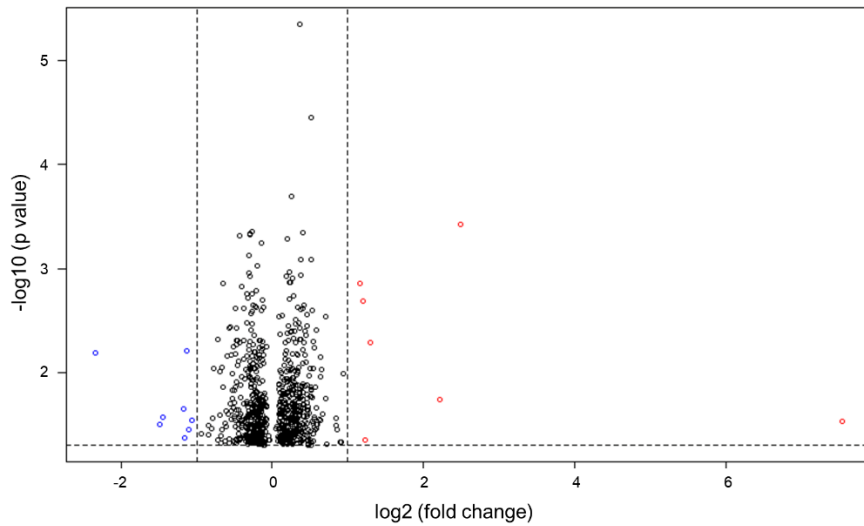


図 3-3. ボルケーノプロット

X軸は HCl 投与（コントロール）群に対するインスリン投与群の fold-change を示す（対数、底は 2）。Y 軸は Welch's t 検定から算出した p value を示す（負の対数、底は 10）。赤い点は fold-change が 2 倍以上、青い点は fold-change が 0.5 倍以下であることを表している。

(Nakai et al. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophys Physicobiol.* 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

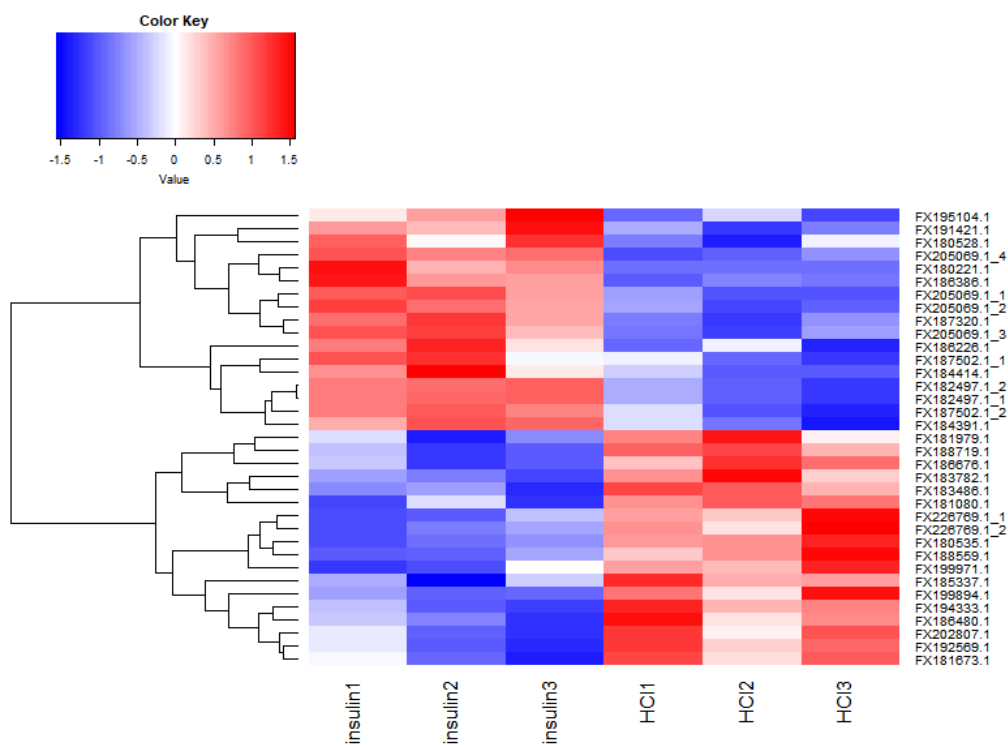


図 3-4. ヒートマップ

縦軸はリン酸化ペプチドを表し、横軸はサンプル名を表す。サンプル名の数値（1、2、3）はサンプル番号を示す。右の数字は *Lymnaea* TSA のアクセッション番号を示す。アクセッション番号のアンダースコアに続く数字は、異なるリン酸化部位を持つ同じタンパク質を区別するために付けられた。カラーキーの値は Z-スコアで表した。

(Nakai et al. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophys Physicobiol.* 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

表 3-2. インスリン処理により定量値が 2 倍以上増加したタンパク質の一覧

Accession no.	Patial sequence [phosphorylation site]	Fold change	Blast hit (e-value < 1e-10)	Complete sequence	Molecular mass (kDa)	pI
FX191421.1	VYTNY[S]PPCTNPAHK	2.025	ankyrin repeat domain-containing protein	◦	29.1	6.33
FX187320.1	YIPEEFAQESVHF[T]PGSHLM[T]SR	2.033	RAC serine/threonine-protein kinase (AKT)	◦	56.3	5.84
FX187502.1_1	KDIPGPFSP[S]PIGDTK	2.043	synaptopodin 2	-	-	-
FX184391.1	[S]TSLDSLTTDHLMTTR	2.323	Rho GTPase activating protein	-	-	-
FX187502.1_2	KDIPGPF[S]PTPIGDTK	2.328	synaptopodin 2	-	-	-
FX186226.1	[S]D[S]EKGGEVLDLSDMSK	2.351	troponin T	-	-	-
FX195104.1	[S]PAFADATFSAVQAALNK	2.473	Rootletin	-	-	-
FX184414.1	KEGS[S]LSSSSNTSNVSNNASVSSQDRK	2.499	eukaryotic translation initiation factor 4B	◦	78.5	6.67
FX182497.1_1	[S]SISPGVYQQLSSSGITDFK	2.556	intermediate filament protein	◦	64.9	5.50
FX182497.1_2	S[S]ISPGVYQQLSSSGITDFK	2.564	intermediate filament protein	◦	64.9	5.50
FX205069.1_1	SPE[S]GVCALENAAESEPVAAVLGSSLGR	3.169	WD repeat-containing protein 44	-	-	-
FX205069.1_2	[S]PESGVCALENAAESEPVAAVLGSSLGR	3.326	WD repeat-containing protein 44	-	-	-
FX180528.1	ASVS[S]IH[S]AKDPLLR	3.435	rapamycin-insensitive companion of mTOR-like (RICTOR)	-	-	-
FX205069.1_3	K[S]PESGVCALENAAESEPVAAVLGSSLGR	3.657	WD repeat-containing protein 44	-	-	-
FX186386.1	K[T]SVEHSSTVSSSELSTDSR	9.175	cytochrome p450	◦	69.9	6.40
FX205069.1_4	SPESGVCALENAAE[S]EPVAAVLG[S]SLGR	11.997	WD repeat-containing protein 44	-	-	-
FX180221.1	L[T]PN[T]ITVGYMINPGESA[S]HPK	1887.27	nuclear receptor coactivator 6	◦	243.3	8.86

アクセッション番号のアンダースコアに続く数字は、異なるリン酸化部位を持つ同じタンパク質を区別するために付けた。

(Nakai et al. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophys Physicobiol.* 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

表 3-3. インスリン処理により定量値が 1/2 以下に減少したタンパク質の一覧

Accession no.	Patial sequence [phosphorylation site]	Fold change	Blast hit (e-value < 1e-10)	Complete sequence	Molecular mass (kDa)	pI
FX180535.1	RTNFEEDD[Y]ASNGG[T]PPPIDVVFR	0.097	endothelin-converting enzyme	o	88.9	5.44
FX186480.1	VTIIE[S]VEKEGNPK	0.227	(uncharacterized protein)	o	76.3	4.76
FX188559.1	DRS[S]V[S]RGGDGDADSVNGR	0.235	ras GTPase-activating protein-binding protein 2	o	57.9	5.78
FX226769.1_1	I[S][S]SGDYALFEAQIEHLLSSK	0.311	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A	-	-	-
FX226769.1_2	IS[S][S]GDYALFEAQIEHLLSSK	0.312	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A	-	-	-
FX188719.1	KQL[S]ESEAVK	0.323	adipocyte plasma membrane-associated protein	o	47.0	8.84
FX199971.1	[Y][T]SNVFAFMNQAIQEFK	0.330	Myosin regulatory light chain 12A	o	21.6	4.58
FX183782.1	GG[S]LLHVSSR	0.347	nuclear pore complex protein Nup107	o	108.6	5.80
FX181673.1	KL[S][S]DTLQK	0.391	(uncharacterized protein)	-	-	-
FX199894.1	SHDQHSGLHPGNSN[S]LDGK	0.429	(uncharacterized protein)	-	-	-
FX185337.1	DSK[S]EDDLVIELAACK	0.433	tubulin-specific chaperone C	o	39.1	5.82
FX202807.1	RK[S][S]SIVPPNPEELQTGGK	0.447	universal stress protein	o	24.3	6.59
FX181080.1	SAANTVAAVA[T]PILK	0.455	FERM domain-containing protein 5	o	72.9	7.27
FX194333.1	GI[T]PGYNR	0.461	microtubule-associated protein 2	-	-	-
FX181979.1	[S]PVSDEHLHK	0.485	myotubularin-related protein 6	o	85.2	6.78
FX183486.1	WTAASAG[T]PVSSPI[T]PLGK	0.485	poly(A)-specific ribonuclease PARN	o	70.4	5.58
FX192569.1	GRD[S]RE[S]PNVNVK	0.497	serine/Arginine-related protein 53	o	40.2	11.48
FX186676.1	AACGIMITA[S]HNPK	0.498	phosphoglucomutase-2	o	68.2	5.80

アクセッション番号のアンダースコアに続く数字は、異なるリン酸化部位を持つ同じタンパク質を区別するために付けた。

(Nakai et al. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophys Physicobiol.* 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

ヒートマップより、インスリンシグナル関連タンパク質 (AKT、RICTOR など)、細胞骨格関連タンパク質 (ankyrin repeat domain-containing protein、synaptopodin 2、rho GTPase activating protein、troponin T、rootletin、中間径フィラメントタンパク質、WD repeat-containing protein 44 (WDR44) など)、RNA 翻訳関連タンパク質 (eukaryotic translation initiation factor 4B

(eIF4B)、nuclear receptor coactivator 6 (NCOA6) など)、代謝酵素 (cytochrome p450) において、インスリン投与群で顕著にリン酸化ペプチドの増加が見られた。

一方、様々なシグナル伝達関連タンパク質 (Ras GTPase-activating protein-binding protein 2、ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A、myotubularin-related protein 6)、細胞骨格関連タンパク質 (Myosin regulatory light chain 12A、tubulin-specific chaperone C、microtubule-associated protein 2)、mRNA 異化関連タンパク質 (poly(A)-specific ribonuclease (PARN))、異化関連タンパク質 (phosphoglucomutase-2) においては、インスリン投与群で顕著にリン酸化ペプチドの減少が起こった。

3-4. 考察

今回の結果より、モノアラガイの CNS にインスリンを投与することで、経路中の AKT や mTORC2 の構成タンパク質である RICTOR がリン酸化されることがわかった。PI3K/AKT/mTOR 経路が活性化されることで、学習・記憶に関与する新規タンパク質の合成や、細胞骨格の不安定化によるシナプス可塑性につながることを示唆された。インスリン投与のみでこれらの変化が起こることは、インスリンを投与したモノアラガイ CNS において味覚嫌悪学習に重要なシナプス間での長期増強が見られたとする Murakami らの報告と一致する (Murakami et al., 2013)。しかし、インスリン投与のみで学習を獲得するわけではないことから (Mita et al., 2014b)、インスリン投与により味覚嫌悪学習の習得・保持に必要な細胞群に可塑性が起こり、この可塑性と学習とが結びつくことで長期記憶の形成が促進されると考えられる。

新規タンパク質合成については、mTORC1 の下流にある eIF4B や、PARN などの転写・翻訳に関連するタンパク質で変化が起こっていることが根拠となる。mTORC1 はシナプス可塑性と記憶形成に必要な新規タンパク質合成を促進することが知られている (Stoica et al., 2011)。ただ、本研究では新規タンパク質合成開始の鍵となる転写因子については同定することができなかった。その理由として、本研究でのインスリン作用時間は 60 分であったがこれは転写因子の活性化を確認するには早すぎたもしくは遅すぎたこと (詳細は後述)、

リン酸化によって制御されない転写因子で活性化が起こっていた可能性、転写因子が今回使用した *Lymnaea* プロテインデータベースに載っていなかったため同定できなかったこと（詳細は後述）などが考えられる。

細胞骨格の不安定化については、様々な細胞骨格関連タンパク質でリン酸化または脱リン酸化が見られた。mTORC2 が細胞骨格のリモデリングを制御することから、今回リン酸化レベルの変化が見られた細胞骨格関連タンパク質のいくつかは mTORC2 を介して制御されていると推測される。mTORC2 がアクチン動態を正に制御することで LTM の形成を促進するという報告もある (Huang et al., 2013)。長期増強では神経突起スパインのダイナミクスに変化が起こるが、この変化はアクチンのダイナミクスの変化と関連している。具体的には、rho GTPase activating protein は、CNS のシナプス可塑性に参与する Rho タンパク質を活性型から不活性型にシフトさせる (Tcherkezian & Lamarche-Vane, 2007)。Synaptopodin はアクチンと相互作用するタンパク質で、哺乳類において CNS のシナプス可塑性に参与していると考えられている (Jedlicka & Deller, 2017)。本研究では筋繊維に存在するアクチン相互作用タンパク質 synaptopodin 2 を同定したが、これはモノアラガイにおいては synaptopodin と区別されない可能性がある。WDR44 は先行研究により AKT によってリン酸化されることが示されているが (Walia et al., 2019)、WDR タンパク質の変異は神経疾患と関連することが多いため (Kim & Kim, 2020)、WDR44 もシナプス形成に参与している可能性がある。他にも中間径フィラメントタンパク質や微小管関連タンパク質 (tubulin-specific chaperone C、microtubule-associated protein 2)、ミオシン関連タンパク質 (Myosin regulatory light chain 12A) など多くの細胞骨格関連タンパク質でリン酸化および脱リン酸化が起こることで、神経細胞のダイナミクスに様々な変化を引き起こし、シナプス可塑性をもたらすと考えられる。モノアラガイへのオペラント学習実験の 1 時間後に CNS タンパク質中のアクチンやミオシン、チューブリンなどでリン酸化レベルの変化が見られたという報告からも (Silverman-Gavrila et al., 2011)、CNS においてインスリンの作用による細胞骨格の変化と LTM 形成に伴う細胞骨格の変化とが密接に関係していることが強く示唆される。

他にも学習・記憶能力やインスリンとの関係が示唆されるタンパク質の変化が見られた。Adipocyte plasma membrane-associated protein (APMAP) について、妊娠糖尿病患者を対象とした研究により、APMAP の発現低下がインスリンシグナル伝達経路の障害をもたらすことがわかったため、インスリン抵抗性に重要な役割を果たしている可能性がある (Ma et al., 2016)。

本研究の限界として、インスリン投与後 1 時間以内にリン酸化レベルが変化したタンパク質しか観察できていないことが挙げられる。インスリン投与に伴う細胞レベルでのシナプス増強や個体レベルでの行動変化がインスリン投与後 1 時間以内に観察されること (Murakami et al., 2013; Totani et al., 2020b) から、1 時間という時間設定は妥当であると考えられる。ただ、インスリンシグナル伝達経路をより網羅的に解析する場合には、インスリン投与後直後からの経時的な変化の観察も必要になると思われる。

モノアラガイを用いたプロテオーム解析の現状と問題点について考察する。モノアラガイで MS 解析を実施した先行研究はいくつかあるが (Rosenegger et al., 2010; Silverman-Gavrila et al., 2011)、ヒトや他の軟体動物のプロテインデータベースを使用しているため、*Lymnaea* プロテインデータベースを用いたリン酸化プロテオーム解析は本研究が初である。ただ、この *Lymnaea* プロテインデータベースは、登録されているタンパク質名称に誤りが多いことや、完全長が登録されているタンパク質が少ないこと、名称違いやペプチド断片のデータしかないことと付随してモノアラガイは未同定のタンパク質が多いために目的タンパク質が登録されていない場合もある、といった改善点が多くある。また、本研究では個別のタンパク質に着目したが、パスウェイ解析の実施には至らなかった。パスウェイ解析については、比較した定量値の倍率の閾値を変更して (例えば ± 1.5 倍など) データ数を増やすことで実施可能になると考えられる。ただ、先に述べたような *Lymnaea* プロテインデータベースの問題や、変化が見られたタンパク質のいくつかが軟体動物特有のものであるといった点から、既存の哺乳類のパスウェイデータをそのまま使用するには大きなハードルがある。今後 *Lymnaea* プロテインデータベースを用いた研究が増えることで、データベースの精度が向上し、詳細なパスウェイ解析が可能になることが期待される。

本研究ではモノアラガイ CNS へのインスリン投与により、AKT や RICTOR といった PI3K/AKT/mTOR シグナル伝達経路のタンパク質や細胞骨格関連タンパク質でリン酸化/脱リン酸化が起こることを明らかにした。このことから、インスリンが PI3K/AKT/mTOR 経路を活性化することで、学習・記憶に関与する新規タンパク質の合成や、細胞骨格の不安定化によるシナプス可塑性につながり、こうした変化が学習能力の向上をもたらす可能性が示唆された。しかし、新規タンパク質合成に関わる転写因子については同定できなかったため、第 4 章ではインスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO に着目し、FOXO と学習能力との関係について研究を行なった。

第 4 章

転写因子 FOXO と学習能力との関係

4-1. 序論

FOXO は Forkhead ファミリーに属する転写因子の一種であり、インスリンシグナル伝達経路の下流で制御され、主に飢餓時に活性化されることで知られている。FOXO は細胞分裂や代謝、アポトーシスの制御などに関与しているが、近年では学習・記憶機構との関連も示唆されている。線虫を用いた研究では、FOXO の線虫ホモログである *daf-16* の変異体では学習能力が低下すること、この *daf-16* 欠失による学習能力低下はインスリンシグナルとは独立しているという報告がある (Vellai et al., 2006; Nagashima et al., 2019)。

モノアラガイにおいて、インスリンと絶食状態はどちらも学習・記憶能力に大きな影響を与えている (図 4-1)。「1-1-(5) インスリンと学習・記憶能力との関係」に記載した通り、インスリンは学習能力を向上させることがわかっている。また絶食状態については、軽度の絶食状態が学習能力を向上させる一方、重度の絶食状態では学習能力が低下することが明らかとなっている (Mita et al., 2014a)。ただし、重度の絶食状態時に CTA 条件づけを行なった後、一定期間餌を与えてから軽い絶食状態もしくはインスリンを投与することで CTA-LTM の想起が見られることから、重度の絶食状態でも記憶の形成そのものは起こっていることが示唆されている (Ito et al., 2015; Totani et al., 2020b)。さらに、一般的に空腹時にはインスリンの分泌量が低下するなど、インスリンと絶食状態の間にも密接な関係がある。モノアラガイの学習においては、重度絶食させた学習能力の低い個体にインスリンを投与すると学習能力が向上することがわかっている (Mita et al., 2014b)。ショウジョウバエにおいては、インスリンが学習能力を向上させることが明らかとなっている一方で (Chambers et al., 2015)、飢餓時の学習能力向上はインスリン分泌量の低下によるものであるという報告もある (Hirano et al., 2013)。

このように、インスリン、絶食状態、学習能力の 3 者の間には複雑な関係がある。そこで、これらの複雑な関係には FOXO が関わっているのではないかという仮説を立てた。本研究では、インスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO に着目し、モノアラガイにおける FOXO の構造と機能、および FOXO と絶食状態、学習能力、インスリンとの関係を明らかにすることを目的とした。

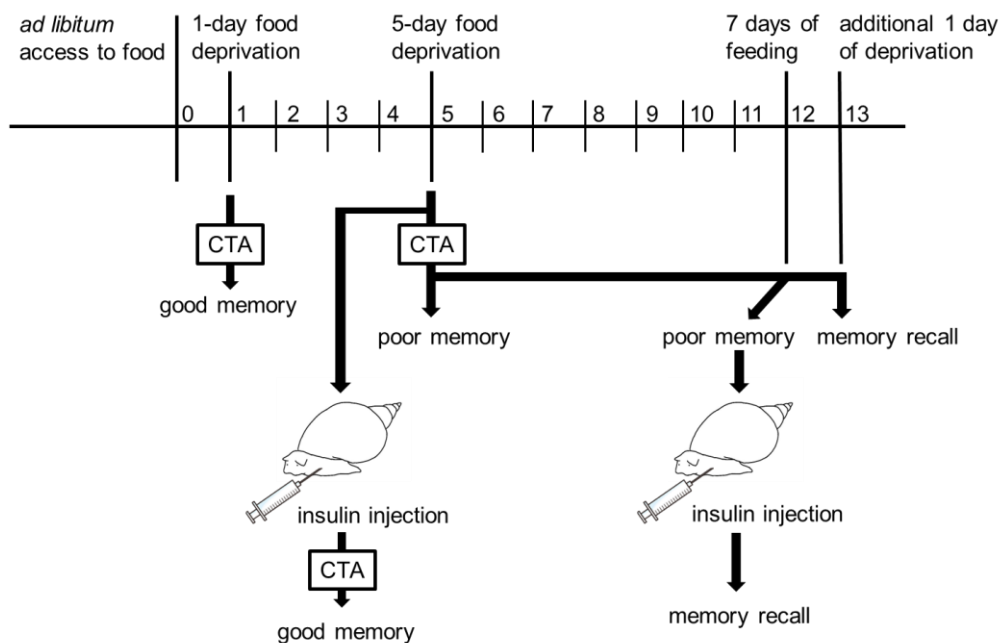


図 4-1. インスリン投与と絶食状態および学習・記憶能力の関係

(Nakai et al. Another Example of Conditioned Taste Aversion: Case of Snails. *Biology*. 2020 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

4-2. 実験方法

(1) 実験動物

2-2-(1) に記載した方法に従った。

(2) 絶食条件の定義

摂食：常時給餌されている状態、1日絶食：24時間絶食させた状態、5日絶食：5日間絶食させた状態、と定義した。

(3) RNA抽出とcRNAの合成

モノアラガイより単離したCNSをチューブに入れて -80°C で凍結後にペッスルで破碎し、ISOGEN II (311-07361; NIPPON GENE, Toyama, Japan) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってtotal RNAを抽出した。cDNAは

ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301; Toyobo, Osaka, Japan) を用いて合成した。

(4) BLAST による mRNA 配列の同定

以前の研究で、RNA-Seq によってモノアラガイ CNS のトランスクリプトーム解析が行われている (Sadamoto et al., 2012)。本研究では、先行研究で得られた Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) データをもとに、NCBI に登録されているアメフラシ *Aplysia carlifornica* の FOXO mRNA

(XM_005112403) の配列と相同性の高いモノアラガイの mRNA 配列を、NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用して探索した。結果、4 つの配列 (FX199776.1, FX255204.1, FX227609.1, FX217506.1) が選択された。

同様に、モノアラガイ CNS の TSA データに基づき、NCBI-BLAST を用いて、他の軟体動物の G6Pase、PEPCK、Catalase、AKT、PIK3CA、および mTOR mRNA と相同性のある mRNA 配列を検索した。これらをそれぞれ LymG6Pase, LymPEPCK, LymCatalase, LymAKT, LymPI3K, LymmTOR と呼んだ。ここで、PI3K はヘテロ接合体二量体であることから、本研究では PI3K の触媒サブユニットである p110 α をコードする遺伝子 PIK3CA に着目した。各遺伝子のアクセッション番号、モノアラガイにおけるアクセッション番号、アミノ酸の相同性を表 4-1 に示す。

表 4-1. FOXO 標的遺伝子とインスリンシグナル関連遺伝子の配列情報

Gene Name	Accession Number of Query Sequence	Accession Number of <i>Lymnaea</i>	Amino Acid Identity
LymG6Pase	<i>Aplysia californica</i> G6Pase (XM_005094411.3)	FX188931.1	60.0%
LymPEPCK	<i>Crassostrea gigas</i> PEPCK (NM_001305293.1)	FX183226.1	73.7%
LymCatalase	<i>Aplysia californica</i> Catalase (XM_005090003.3)	FX188459.1	79.1%
LymPIK3CA	<i>Aplysia californica</i> PIK3CA (XM_013086940.2)	FX182614.1	84.3%
LymAKT	<i>Aplysia californica</i> AKT (XM_035970173.1)	FX187320.1	94.3%
LymmTOR	<i>Aplysia californica</i> mTOR (XM_013080183.2)	FX180237.1	90.2%

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(5) PCR と 3'RACE 法による mRNA 配列の同定

2-4-(4) で選択したモノアラガイ FOXO mRNA の 4 つの配列が同じ mRNA 配列上にあることを確認するために、各配列をつなぐように設計した FOXO (i) および FOXO (ii) プライマー (図 4-2、表 4-2) と PCR 酵素 Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて PCR を行った。PCR 条件は 94°C で 3 分間 cDNA を変性後、94°C 30 秒、68°C 1 分 30 秒を 30 サイクル、72°C 5 分で実施した。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動後にゲルから切り出して NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) で精製した。シーケンス解析はユーロフィンジェノミクス株式会社の DNA シーケンス受託サービスに委託した。

解析結果より 4 つの断片は同じ mRNA 配列上にあることが確認されたが、得られた mRNA 配列には ORF の終止コドンがなかったため、3' 末端が欠損

していると判断した。3'末端の配列を決定するため、3'RACE 実験を行った。

4-2-(3) に記載した方法で得られた total RNA、3' RACE adaptor プライマー (表 4-2)、および 5'-Full RACE Core Set (Takara Bio) に含まれる AMV Reverse Transcriptase XL、RNase Inhibitor、10×RT Buffer を用いて逆転写を行った。温度条件は 30°C10 分、50°C60 分、80°C2 分とした。

得られた逆転写反応液と 3' RACE FOXO specific outer プライマーおよび 3' RACE outer プライマー (表 4-2) を組み合わせて 1st PCR を行なった。次に、1st PCR 反応液と 3' RACE FOXO specific inner プライマーおよび 3' RACE inner プライマー (表 4-2) を組み合わせて 2nd PCR を行った。各 PCR には PCR 酵素として Ex Taq (Takara Bio) を用い、94°Cで 2 分間 cRNA を変性後、94°C30 秒、55°C30 秒、72°C3 分を 30 サイクルの PCR 条件で行った。2nd PCR 反応液を 1% アガロースゲル電気泳動後、バンドをゲルから切り出し、先に記載された方法で PCR 産物の精製およびシーケンス解析を行った。

Distribution of the top 4 Blast Hits on 4 subject sequences

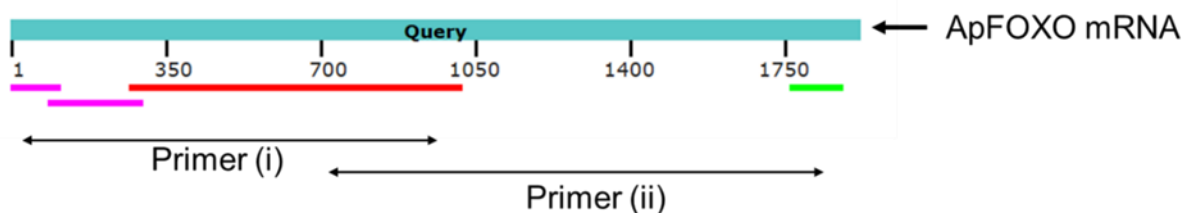


図 4-2. LymFOXO の 4 つの mRNA 配列断片と設計したプライマーの位置

表 4-2. PCR に使用したプライマー

Gene Name	Accession Number	Forward or Reverse	Primer Sequence
FOXO (i)	FX227609.1	Forward	CGAACCCCAAACAAGAGCG
	FX199776.1	Reverse	TGCTGCTTTGGGTATGGAGG
FOXO (ii)	FX199776.1	Forward	GGAGGTGACCAATTCCAGCA
	FX217506.1	Reverse	CCCAGAGGTGAGTGGTTTCC
3' RACE adaptor	-	-	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCATA TAGGTTTTTTTTTTTTTVN
3' RACE FOXO-specific outer	-	Forward	TCTGTGAACACACAGCAGCA
3' RACE outer	-	Reverse	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3' RACE FOXO-specific inner	FX217506.1	Forward	GCAGCAGGCTTCTATACTTCG
3' RACE inner	-	Reverse	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACT ATAGG

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(6) LymFOXO アミノ酸配列の同定と分子系統樹の作成

4-2-(5) で決定したモノアラガイ FOXO mRNA 配列に含まれる ORF は、ApE (A plasmid Editor, <https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) を用いて決定した。モノアラガイ FOXO (LymFOXO)、アメフラシ FOXO (ApFOXO)、ヒト FOXO3 (HsFOXO3) のアミノ酸配列の多重配列アライメントは、ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて作成した。異なる生物種で同定されている FOXO-like タンパク質の分子系統樹は、MEGA 11 ソフトウェア (<https://www.megasoftware.net/>) を用いて、近接結合法 (Neighbor-joining methods) により作成した。分子系統樹の作成に用いた FOXO-like タンパク質の一覧を表 4-3 に示す。

表 4-3. 分子系統樹作成に用いた FOXO-like タンパク質の一覧

Protein Name	Accession Number
<i>Aplysia californica</i> forkhead box protein O	XP_005112460.1
<i>Biomphalaria glabrata</i> forkhead box protein O-like	KAI8758266.1
<i>Bombyx mori</i> forkhead box sub-group O	AFD99125.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> DAF-16	AAC47803.1
<i>Crassostrea hongkongensis</i> forkhead box O protein	APG29285.1
<i>Drosophila melanogaster</i> forkhead box, sub-group O, isoform B	NP_996205.1
<i>Elysia marginata</i> forkhead box O protein	GFR80317.1
<i>Gigantopelta aegis</i> forkhead box protein O-like	XP_041351714.1
<i>Haliotis discus hannai</i> FoxO	QOI08485.1
<i>Homo sapiens</i> forkhead box protein O1	NP_002006.2
<i>Homo sapiens</i> forkhead box protein O3 isoform 1	NP_001446.1
<i>Homo sapiens</i> forkhead box protein O4 isoform 1	NP_005929.2
<i>Homo sapiens</i> forkhead box protein O6	NP_001278210.2
<i>Lymnaea stagnalis</i> forkhead box protein O	BEL01681.1
<i>Mus musculus</i> forkhead box protein O1	NP_062713.2
<i>Mus musculus</i> forkhead box protein O3	NP_001363896.1
<i>Mus musculus</i> forkhead box protein O4	NP_061259.1
<i>Mus musculus</i> forkhead box protein O6	NP_918949.1
<i>Paramuricea clavata</i> forkhead box O-like isoform X1	CAB3987597.1
<i>Pomacea canaliculata</i> forkhead box protein O-like	XP_025097678.1
<i>Sinonovacula constricta</i> FOXO	AYW35875.1
<i>Xenopus laevis</i> forkhead box protein O1	NP_001086417.1
<i>Xenopus laevis</i> forkhead box protein O3	NP_001086418.1
<i>Xenopus laevis</i> forkhead box protein O4 L homolog	NP_001154870.1
<i>Xenopus laevis</i> forkhead box protein O6 S homolog	NP_001152754.1

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

(7) Real-time PCR

目的の mRNA を発現している神経節を同定する実験では、単離した CNS を

神経節の種類ごとに分け、3 個体分の神経節を 1 サンプルとして、4-2-(3) に記載した方法で cDNA を合成した。それ以外の実験では神経節を分けずに cDNA 合成を行なった。

Real-time PCR は THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo) と StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Bedford, MA, USA) を用いた比較定量法により行った。各 mRNA 発現量は、18 s ribosomal RNA (rRNA) と β -tubulin RNA、または β -actin RNA と β -tubulin RNA の発現量によって標準化した。使用したプライマー配列を表 4-4 に示す。全ての Real-time PCR プライマーの増幅効率 は 90 から 110% の間にあった ($R^2 = 0.95 - 0.99$)。

PCR 条件は、95°C30 秒、次いで 95°C 5 秒の変性と 60°C10 秒のアニーリングを 40 サイクル繰り返した。融解曲線分析は、60°C から 95°C まで、0.3°C/秒の加熱速度で実施した。

表 4-4. Real-time PCR に使用したプライマー

Gene Name	Accession Number	Forward or Reverse	Primer Sequence 5'-3'	Product Size (bp)
LymFOXO	LC773945.1	Forward	CCTCCATACCCAAAGCAGCA	182
		Reverse	CACTGAACAAGCCCTTTGCC	
LymG6Pase	FX188931.1	Forward	CCACGTCAACGGTGAACCTA	258
		Reverse	AGCACACGTTTTCCGACTGA	
LymPEPCK	FX183226.1	Forward	GATGCCACGACCAGTACAA	192
		Reverse	TCCATCCCTCATCTCTGGCA	
LymCatalase	FX188459.1	Forward	TGGGACTTCTTCACTCTGCG	136
		Reverse	TCTCAGCCTTGTTGACCAGC	
LymPI3KCA	FX182614.1	Forward	CTCAAGTCCACGATGGGACC	153
		Reverse	AACAGCTGAAGATTGCCCCA	
LymAKT	FX187320.1	Forward	GATGACCAGCAGACTGGACC	119
		Reverse	CTGCCGATGTGCTGAGGTAA	
LymmTOR	FX180237.1	Forward	TGCAGCAGATCCAGCAGAAA	274
		Reverse	AAGCGGTTATCTCGCCTAGC	
18s rRNA	Z73984.1	Forward	CTCCTTCGTGCTAGGGATTG	106
		Reverse	GTACAAAGGGCAGGGACGTA	
β -actin	KX387884.1	Forward	GCAGAAGGAAATCACAGCACTGG	114
		Reverse	GTGGAGAGAGAGGCAAGGATGG	
β -tubulin	KX387888.1	Forward	CAAGCGCATCTCTGAGCAGTT	108
		Reverse	TTGGATTCCGCCTCTGTGAA	

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(8) 免疫組織化学染色

冷 *Lymnaea* 生理食塩水中でモノアラガイから CNS を単離後、4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液中で室温 1~2 時間ゆっくり振盪し、組織を固定した。その後、溶液を 30%スクロース/0.4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液に入れ替えて室温 1 時間もしくは 4°C で 1 晩ゆっくり振盪し、組織内の水分を置換した。最後に、CNS を O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) 中に沈め、液体窒素で冷却したイソペンタン内で冷却して包埋した。包埋後の CNS は -80°C で保存した。

包埋した CNS からクライオスタット (CM1860; Leica, Nussloch, Germany) で厚さ 10 μm の凍結切片を水平に切り出し、MAS コートスライドガラス (Matsunami glass, Osaka, Japan) 上に貼り付けた。作成した凍結切片はドライヤーで 30 分間風乾した後、-20°C で保存した。

-20°C から取り出した切片をドライヤーで 30 分間風乾した後、PBS 中に 5 分間 $\times 2$ 回浸漬し、PBS-Tx (0.1% TritonX-100 を含む PBS) 中に 20 分間浸漬した。次に切片を 10 mM クエン酸ナトリウム溶液 (クエン酸溶液とクエン酸三ナトリウム溶液を pH6.0 になるよう混合したもの) 内に入れ、15 分間 121°C でオートクレーブすることにより抗原を賦活化した。常温になるまで室温で静置し、PBS-Tx で 5 分間 $\times 2$ 回洗浄後、切片の周りを PAP ペンで囲った。5% BSA/PBS-Tx 溶液を切片にのせて室温 1 時間静置し、抗体の非特異的反応を防ぐ目的でブロッキングを行なった。5% BSA/PBS-Tx 溶液を取り除き、一次抗体を 1% BSA/PBS-Tx で希釈した溶液を切片にのせ、1 晩 4°C で静置した。本研究では一次抗体として Anti-FOXO3 rabbit polyclonal antibody (Abcepta, San Diego, CA, USA) を 50 倍希釈して用いた。

翌日、PBS-Tx で 5 分間 $\times 3$ 回洗浄後、二次抗体を PBS-Tx で希釈した溶液を切片にのせ、30 分静置した。本研究では二次抗体として Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG H&L antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA) を 1000 倍希釈して用いた。PBS-Tx で 5 分間 $\times 3$ 回洗浄後、対比染色として DAPI (Roche, Basel, Switzerland) 染色を 30 分間行った。染色後、切片を Immu-Mount (Thermo Scientific) とカバーガラスで封入した。封入後の切片はカメラ付き蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X700 または顕微鏡: Nikon Eclipse E600; カメラ: Olympus DP70) で観察・撮影を行った。

LymFOXO に対する一次抗体の有効性はウェスタンブロッティングで確認

した。結果、LymFOXO の分子量である 70.7 kDa 付近にバンドが認められた。また、一次抗体のブロッキングペプチドを用いて吸収試験を行ったところ、70.7 kDa 付近のバンドは消失した。これらの結果から、本研究で使用した一次抗体は LymFOXO に特異的に結合できることがわかった。

(9) CTA トレーニング

2-2-(2) に記載した方法に従った。

(10) CNS へのインスリン投与

3-2-(2) に記載した方法に従った。

(11) 統計解析

データは平均値±標準誤差で表し、 $p<0.05$ で統計的に有意であるとみなした。3 群以上のデータの比較解析には one-way もしくは two-way ANOVA と Holm 法による補正を行った Welch's t test を、2 群間の比較解析には Welch's t test を行なった。統計解析ソフトは R (version 4.2.1; <https://www.r-project.org/>) を使用した。

4-3. 実験結果

(1) 推定した LymFOXO のアミノ酸配列

モノアラガイの FOXO (LymFOXO) の mRNA 配列およびアミノ酸配列を推定するため、アメフラシ *Aplysia californica* の FOXO (ApFOXO) (Accession no.: XM_005112403) をクエリ配列として BLAST 検索を行った。*Lymnaea stagnalis* mRNA TSA データベースでヒットした 4 つの mRNA 配列 (accession no.: FX199776.1, FX255204.1, FX227609.1, FX217506.1) を用いて、PCR 法と 3' RACE 法により 5'側と 3'側に非翻訳領域を含んだ全長の open reading frame (ORF) を得た。LymFOXO は 642 アミノ酸からなり、分子量

は約 70.7 k であることがわかった。得られた配列は GenBank に登録した (mRNA: LC773945.1, タンパク質: BEL01681.1)。

LymFOXO の推定アミノ酸配列と ApFOXO 並びにヒト *Homo sapiens* FOXO3 (HsFOXO3) のアミノ酸配列を用いて多重アラインメントを行った (図 4-3)。HsFOXO3 を用いたのは、線虫とショウジョウバエの FOXO が HsFOXO3 のオルソログであるのと (Hwangbo et al. 2004)、LymFOXO と高い相同性を持つヒト遺伝子の BLAST 検索で HsFOXO3 がヒットしたからである。アラインメントの結果、LymFOXO と ApFOXO は 65.8% のアミノ酸同一性を示し、LymFOXO と HsFOXO3 は 25.2% のアミノ酸同一性を示した。また、Forkhead box と呼ばれる特徴的なタンパク質ドメイン (DNA 結合モチーフ) や、HsFOXO3 において活性制御に重要な部位である 32 番目のトレオニン、253 番目のセリン、315 番目のセリン (Chen et al. 2017) が種を超えて保存されていることが示唆された。

次に、様々な動物種から推定された FOXO-like タンパク質の分子系統樹を neighbor-joining 法を用いて作成した (図 4-4)。LymFOXO は別の淡水産巻貝 *Biomphalaria glabrata* の FOXO と最も近縁であり、他の軟体動物の FOXO と共に 1 つのファミリーに軟体動物門としてクラスター化された。このクラスターは線形動物門や摂食動物門と共に無脊椎動物グループを形成した。脊椎動物の FOXO には複数のアイソフォームがあり、ヒトでは FOXO1、FOXO3、FOXO4、FOXO6 の 4 つのアイソフォームが知られている。しかし、図 4-3 より FOXO のアイソフォームが脊椎動物グループのみに見られることや、線虫やショウジョウバエのような FOXO についての研究が盛んな無脊椎動物においても FOXO が 1 種類しか報告されていないことから、モノアラガイの FOXO は 1 種類しか存在しないことが示唆された。

LymFOXO	-----MD	ASDIDLDDLP	NFEPQTRARS	NWPLRPSRE	LESQSSPVNG	DESSNGIDQH	GSVKDPLG--	
ApFOXO	-----MD	ATDIDLDDLP	NFEPQTRARS	NTWPLRPSRD	LDPQSSPVPS	EEAPNGVDQQ	GSVKDPLG--	
HsFOXO3	MAEAPASPAP	LSPLEVELDP	EFEPQSRPRS	CTWPLQRPEL	QASPAKPSGE	TAADSMIPPEE	EDDEDDEDGG	
			***	*****	*		*	
LymFOXO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
ApFOXO	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
HsFOXO3	GRAGSAMAIG	GGGSGTGLS	GLLLEDSARV	LAPGGQDPGS	GPATAAGGLS	GGTQALLQPQ	QPLPPPQPGA	
				Forkhead domain				
LymFOXO	----LTAKKC	GSRRNAWGNL	SYADLITKAI	QSSPEKRLTL	SQIYDWMVQN	VPYFKDKGDS	TSSAGWKNSI	
ApFOXO	----LTAKKS	GSRRNAWGNL	SYADLITKAI	QNSPEKRLTL	SQIYDWMVQN	VPYFKDKGDS	TSSAGWKNSI	
HsFOXO3	AGGSGQPRKC	SSRRNAWGNL	SYADLITRAI	ESSPDKRLTL	SQIYEWVRC	VPYFKDKGDS	NSSAGWKNSI	
	*	*****	*****	*	*****	*****	*****	
				NLS				
LymFOXO	RHNLSLHSRF	MRIQNEGTGK	SSWVVLNPD-	AKPGKTPRRR	AGSMETKS-Y	EKKRGRVRKK	VEALRAAMEN	
ApFOXO	RHNLSLHSRF	MRIQNEGTGK	SSWVVLNPD-	AKPGRTPRRR	AGSMETKS-Y	EKKRGRVRKK	VEALRAMEN-	
HsFOXO3	RHNLSLHSRF	MRVQNEGTGK	SSWVLIINPDG	GKSGKAPRRR	AVSMDNSNKY	TKSRGRAAKK	KAALQTAPES	
	*****	**	*****	****	**	*	* * * * *	
LymFOXO	G-----GSL	SPGG--SDDY	LDALNFENFR	PRASSNASSC	G-RLSPIHAV	AEPDLHDNQV	PPMSPIPWGA	
ApFOXO	-----GTL	SPGG--SEDY	LDMS-FGDFR	PRASSNASSC	G-RLSPIHAV	AEPDLHDNQV	PPMSPIPWGA	
HsFOXO3	ADDSPSLSK	WPGSPTSRS	DELDAWDFR	SRTSNASTV	SGRLSPIMAS	TELDEVQDDD	APLSPMLYSS	
	**	*	**	*****	*****	*	**	
				NES				
LymFOXO	EVTNSSNLYI	GDGYSDLVDS	LVDGMKLTNQ	EN-----LKM	DMRDPYISGA	SREFNGQSSS	FMGVDSAPSG	
ApFOXO	EVSNSPTLYP	ADGYSDLVDS	LVDGMKLTSTQ	DNSIKMEVVS	GMRDPYLSGA	SREFNNQPST	FMSVERQ--G	
HsFOXO3	SASLSP----	-----	-----	-----	SVSKPCTVEL	PRLTDMAGTM	NLNDGLTENL	
	*				*	*		
	NES							
LymFOXO	LDNQYNHLPA	PPPYPKQQQ--	--QMNGLDY	PRQDFNN-LR	LQHRSSPVTN	GSANGFTQSN	LYNEEYNEAV	
ApFOXO	LDNQYSHLPA	PPPYPKQQQQ	AQPQLNSLEF	PRQNFSPGLR	LQCRPSPANN	ASG-----	-----	
HsFOXO3	MDDLNDNITL	PPSQPSPTGG	LMQRSSSFY	TTKSGSLGSP	TSSFNSTVFG	PSS-----	-----	
	*	**	*		*	*		
LymFOXO	MSIKQEAKGL	FSEDYNDVVM	NIKQEAKGMS	PVRLAAPSAL	SVNTQQQLNS	PDRSQQSPN	TGTYNHSLSP	
ApFOXO	-TFSQSDMYN	DSVQDFNEGV	LIKQEPDGLS	PVGMGPGNTL	SINTQQQQQQ	LSSPDRSQQG	SPSSGVFAHL	
HsFOXO3	-----	----LNSLRQ	SPMQTIQENK	PATFSSMSHY	GNQTLQDLLT	SDSLSHS---	-----	
			*	*	*			
LymFOXO	QPQSGLVNGQ	HSLTLLNCQV	SPQQ--GRHLA	EQQQQNITTA	TLQQQ---QA	LQQASILREA	LTRG--SYRH	
ApFOXO	SPQPTMVNGQ	PALSPLTCQV	SPQPPNRIMS	PQQQQPITTA	SLQQQALLQ	ATQASILREA	LTRGPPAYRS	
HsFOXO3	--DVMMTQSD	PLMSQASTAV	SAQNSRRNVM	LRNDPMSFA	AQPNQG--SL	VNQNLLHHQH	QTQG--ALGG	
			**	*	*	*	**	
LymFOXO	PSSNTPSPPTY	SPMGNHSPLG	PTSNMNGLL	NISMTLNSDI	SPNHQSLTSG	QLRVINENFT	DNHFINSNGM	
ApFOXO	HTASTPSPTF	SPVANMSPLA	APSSNVNSGM	LGLSPHHQLR	SISENYAEGP	QHMVNGSSPG	GDGGGMANN	
HsFOXO3	SRALSNSVSN	MGLSESSSLG	SAKHQQQSPV	SQSMQTLSDS	LSGSSLYSTS	ANLPVMGHEK	FPSDDLDMF	
	*	*	*					
	FOXO-TAD							
LymFOXO	GGVCNNNPGM	PLDIDMELIS	GLDYDMDQVI	KQELTHEGNL	DSNFEAGQNV	VH-----		
ApFOXO	NNNNNNNGV	PLDIDIDLIA	GLDYDMDQVI	KQELSLEGNL	DFNFDSAPTS	VGQNVVH		
HsFOXO3	NGSLECDMES	IIRSELMDAD	GLDFNFDLSI	STQNVVGLNV	GNFTGAKQAS	SQSWVFG		
			***	*	*			

図 4-3. LymFOXO と ApFOXO および HsFOXO3 の推定アミノ酸の比較
オレンジの枠は HsFOXO3 の AKT によるリン酸化部位を、*は保存されたアミノ酸を示す。

NLS: nuclear localization signal; NES: nuclear export signal; FOXO-TAD: transactivation domain of the FOXO protein family

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

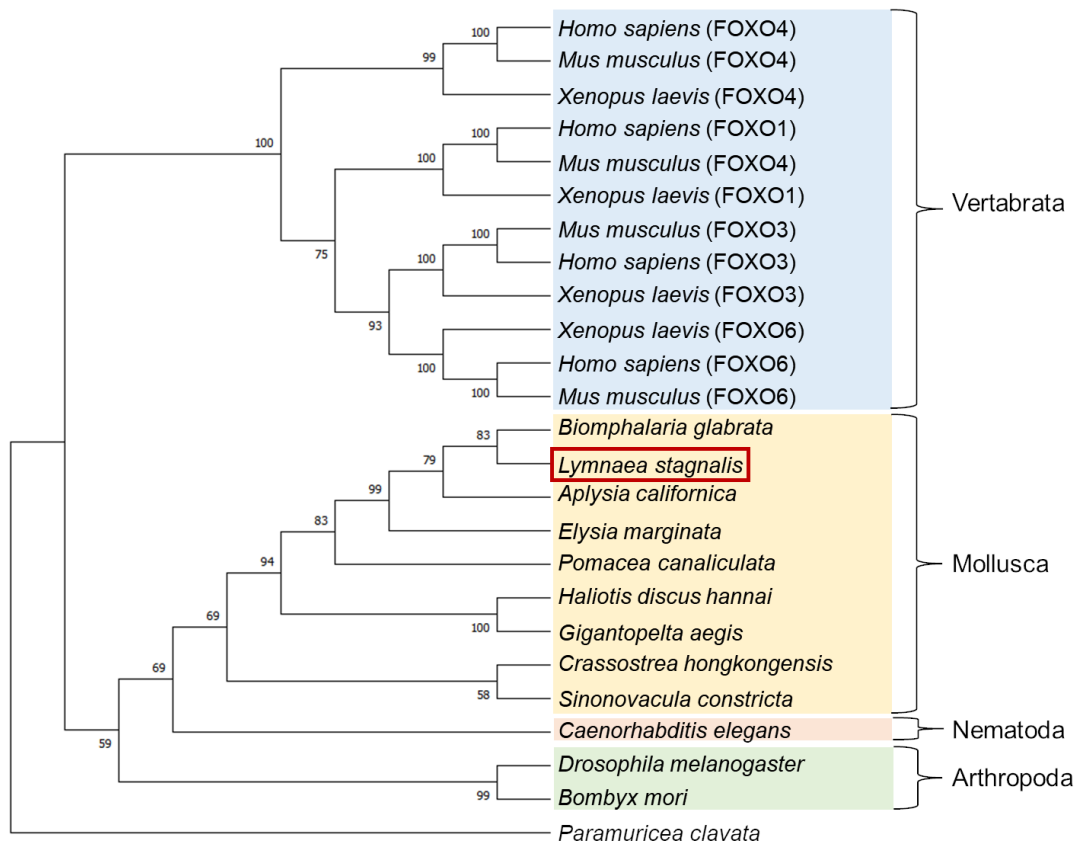


図 4-4. 近傍結合法による 25 種の FOXO-like タンパク質の分子系統樹
各分岐のブートストラップ値は系統樹を 1000 回検定して算出し、パーセンテージで表した。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*: 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(2) CNS 内での LymFOXO mRNA の局在

摂食させたモノアラガイの各神経節から抽出した mRNA を real-time PCR で定量したところ、LymFOXO は全ての神経節でユビキタスに発現しており、神経節間での有意な差は見られなかった ($p=0.57$, $n=3$) (図 4-5)。

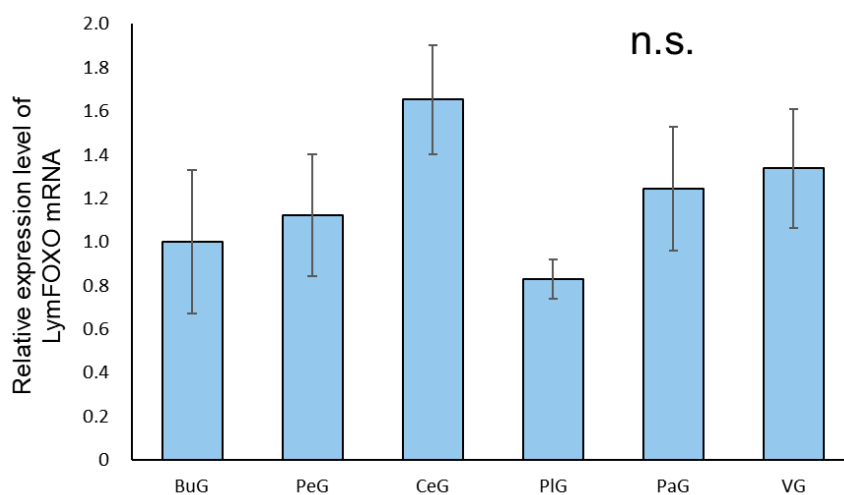


図 4-5. 摂食させたモノアラガイにおける LymFOXO mRNA 相対発現量
mRNA 発現量は 18S rRNA および β -tubulin に対して正規化した後に求め、
BuG での発現量を 1 とした相対値で表した。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(3) CNS 内での LymFOXO タンパク質の局在

摂食させたモノアラガイから単離した CNS 切片と抗 FOXO3 ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行なった (図 4-6)。

LymFOXO タンパク質は全ての神経節でユビキタスに発現していた。1つ1つの細胞に着目すると、全体的に核内よりも細胞質側に局在していた。また、BuG の B4 細胞と CeG の CGC において LymFOXO が局在していることが確認できた。一次抗体を入れずに二次抗体のみを適用したネガティブコントロール実験ではこれらのシグナルは観察されなかった。

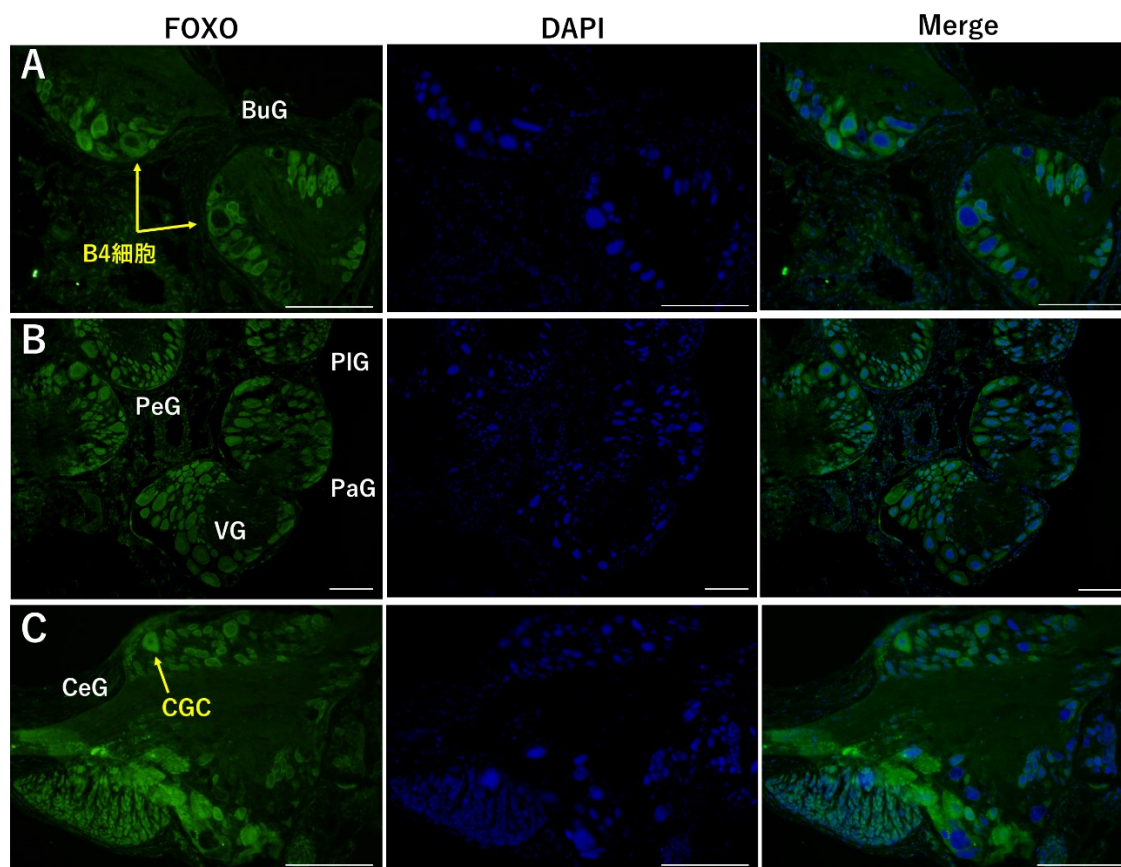


図 4-6. 摂食させたモノアラガイにおける LymFOXO タンパク質の発現
スケールバー: 100 μm 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

(4) CTA による行動変化

摂食させたモノアラガイと 1 日絶食させたモノアラガイを用いて CTA トレーニングを実施した。結果を図 4-7 に示す。

どの実験群も pretest での咀嚼回数に有意差は見られなかった ($p > 0.05$)。CTA トレーニング後、摂食させたモノアラガイと 1 日絶食させたモノアラガイのどちらにおいても forward 群 (摂食群: $n=28$; 1 日絶食群: $n=19$) ではコントロール群である backward 群 (摂食群: $n=14$; 1 日絶食群: $n=18$) や naive 群 (摂食群: $n=9$; 1 日絶食群: $n=19$) と比較してスクロース溶液に対する咀嚼回数が有意に抑制された ($p < 0.01$)。

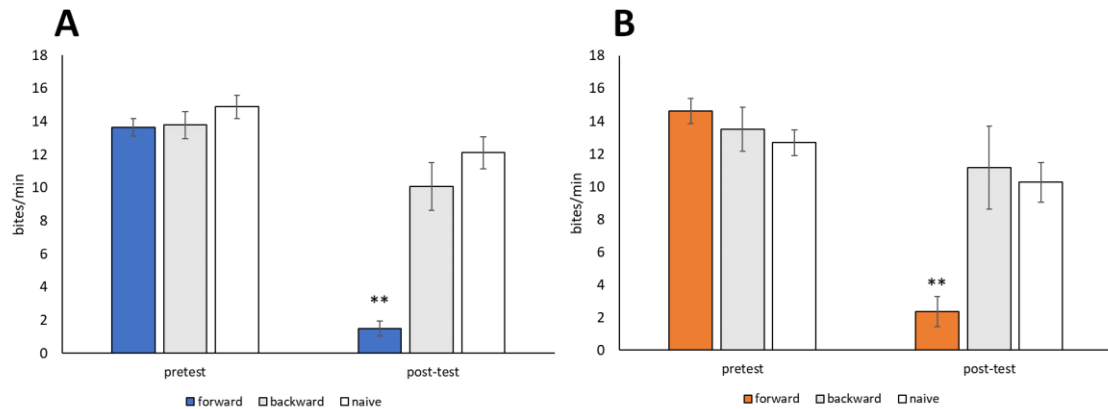


図 4-7. CTA トレーニングの結果

A: 摂食させたモノアラガイ、B: 1日絶食させたモノアラガイ。**: $p < 0.01$ 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(4) 様々な条件下での LymFOXO の CNS 内局在変化

絶食条件下、学習条件下、インスリン投与条件下で LymFOXO の CNS における局在に変化が見られるのかを免疫組織化学染色により調べた。CNS の中でも特に、CTA に強く関与していることが示唆されている BuG、CeG、PeG に着目した。

絶食条件下における LymFOXO の局在を図 4-8 に示す。1日絶食または5日絶食の個体群では、摂食させた個体群での結果と比較して LymFOXO の局在が核内に見られた。

複数の CNS で LymFOXO の局在を確認したところ、摂食させた個体群の CNS (n=5) のうち、3個は細胞質への局在、1個は核内への局在、1個ははっきりしない局在を示した。1日絶食させた個体群の CNS (n=5) では、1個は細胞質への局在、3個は核内への局在、1個ははっきりしない局在を示した。5日絶食させた個体群の CNS (n=2) では、1個は核内への局在、1個ははっきりしない局在を示した。これらの結果より、LymFOXO は絶食条件下で核に移行することが示唆された。

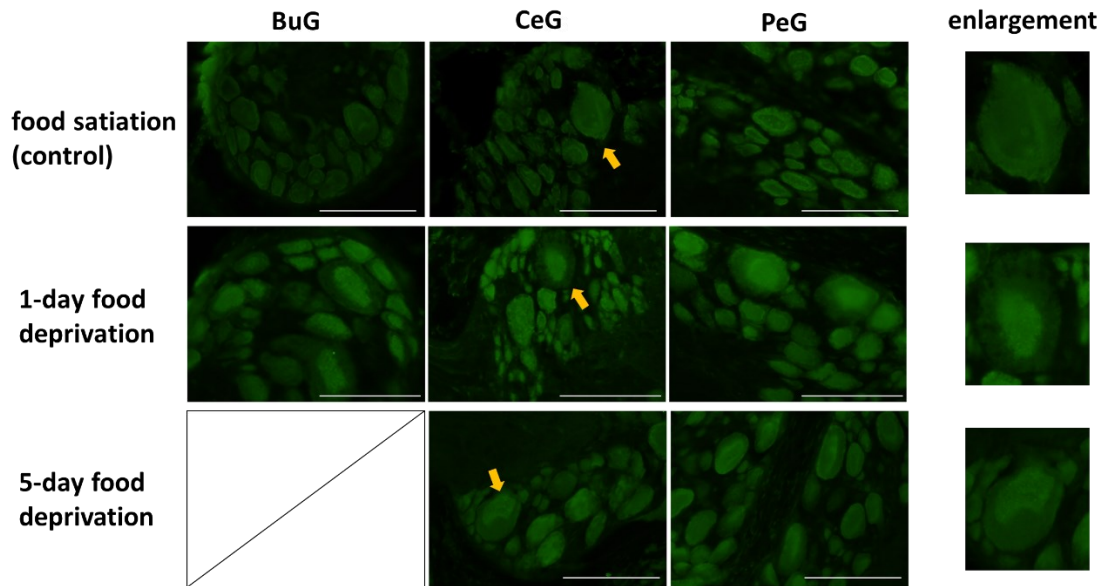


図 4-8. 絶食による LymFOXO タンパク質の局在変化

矢印の細胞は CGC を表す。矢印をつけた細胞を拡大し、右側に示している。
スケールバー: 100 μm 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

摂食させたモノアラガイに CTA 学習実験を行った後、LymFOXO タンパク質の局在を調べた。結果を図 4-9 に示す。LymFOXO タンパク質の局在は forward 群 (n=3) では主に核に見られた。一方、コントロール群である backward 群 (n=2) と naive 群 (n=2) では細胞質に局在する傾向があった。

また、MIP を合成することで知られている LGC で、CTA 後の LymFOXO の核内局在が確認できた。

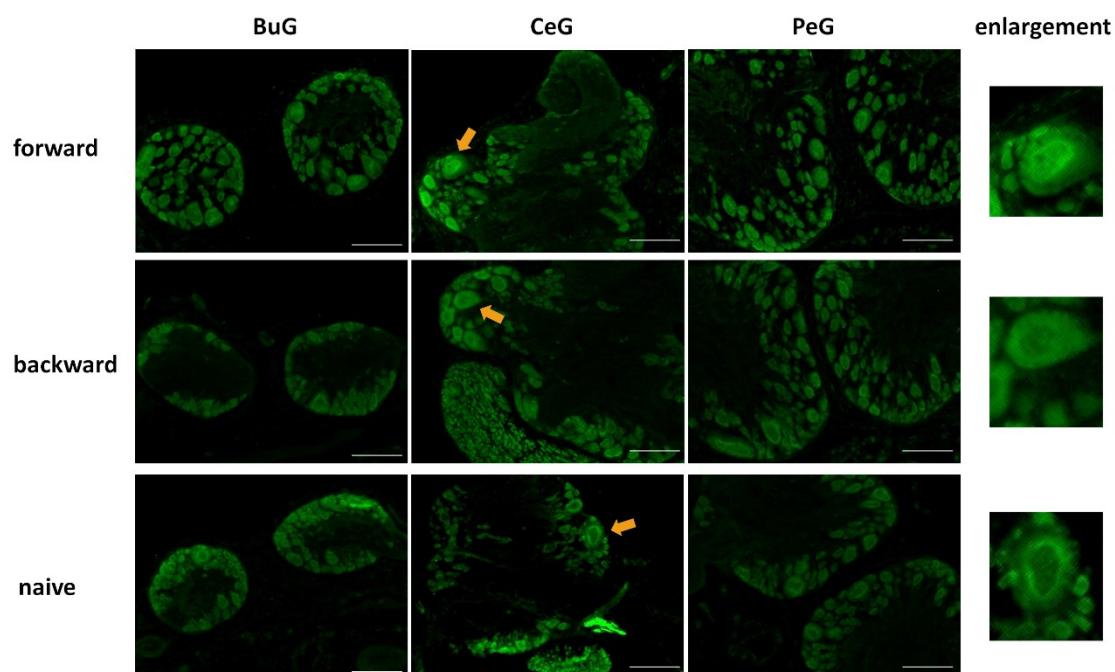


図 4-9. 摂食させたモノアラガイへの学習による局在変化

矢印をつけた細胞を拡大し、右側に示している。スケールバー: 100 μm 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

1日絶食させたモノアラガイに CTA 学習実験を行った後、LymFOXO タンパク質の局在を調べた。結果を図 4-10 に示す。LymFOXO タンパク質の局在は forward 群 (n=4) では核に見られた。コントロール群である backward 群 (n=3) と naive 群 (n=3) では主に核付近に局在が観察された。これは、全ての実験群が軽度の絶食条件に置かれたことで、学習の種類に関わらず絶食依存的に LymFOXO が核内に移行したからであると考えられる。

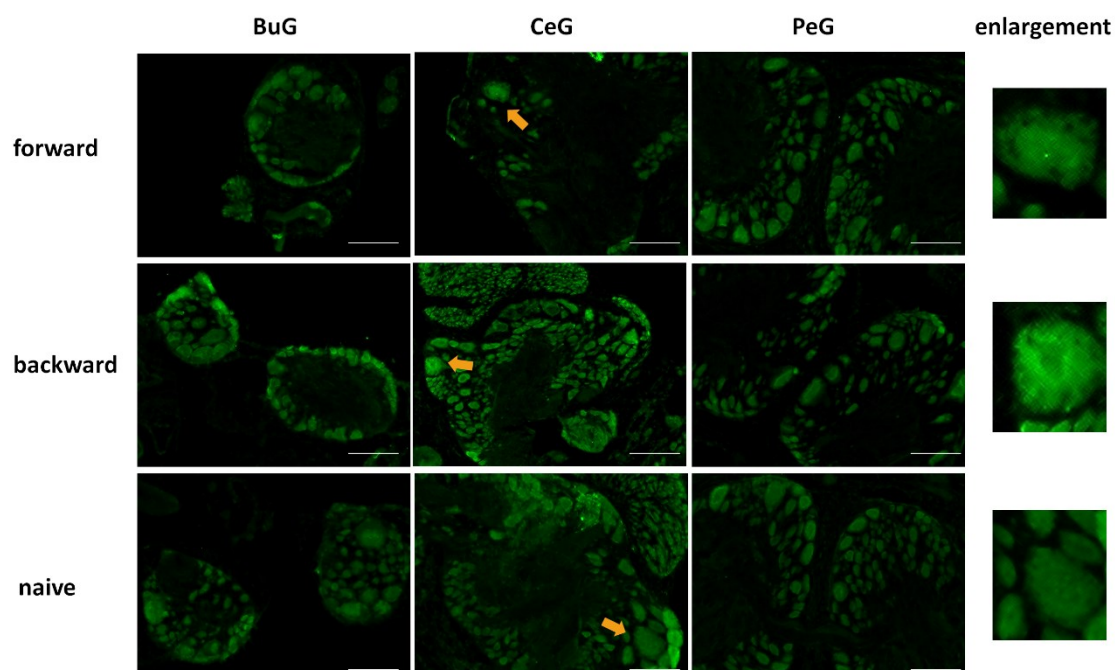


図 4-10. 1 日絶食させたモノアラガイへの学習による局在変化

矢印をつけた細胞を拡大し、右側に示している。スケールバー: 100 μm 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

インスリン投与条件下における LymFOXO の局在を図 4-11 に示す。インスリンの作用による影響のみを確認するため、摂食させた個体群から CNS を単離してインスリンまたは HCl に浸漬後、免疫組織化学染色を行なった。インスリン投与群では CNS における LymFOXO の局在は細胞質に見られた (n=3)。HCl を用いたコントロール群では、摂食させた個体群での結果と同様に LymFOXO は細胞質に局在していた (n=3)。

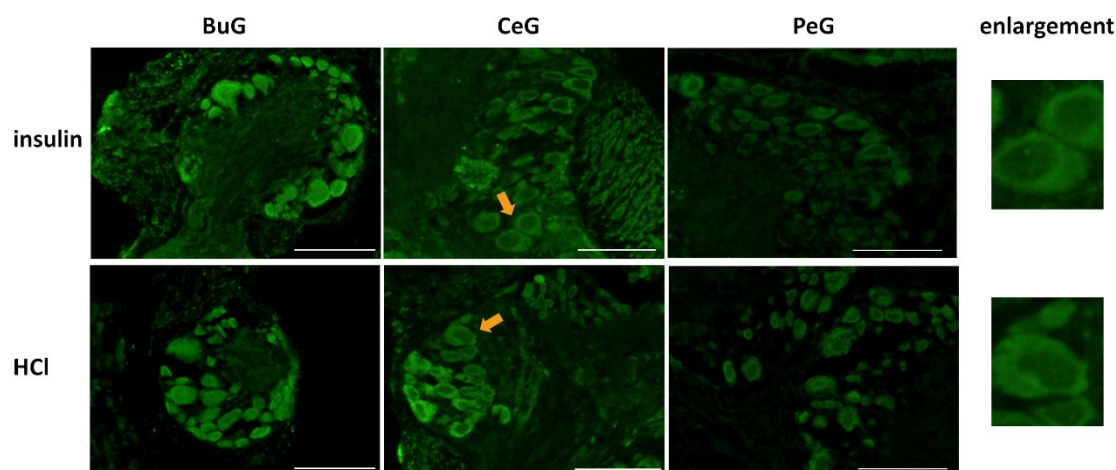


図 4-11. 摂食させた個体群へのインスリン投与による局在変化

矢印をつけた細胞を拡大し、右側に示している。スケールバー: 100 μ m

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

(5) LymFOXO の局在変化に伴う下流遺伝子の発現量変化

FOXO は転写因子であるため、核内に局在している時は転写因子として活性化していると予想した。そこで、各条件下での FOXO の標的遺伝子の発現量の変化を real-time PCR で測定した。

摂食させた個体群と 1 日絶食させた個体群について、LymFOXO、LymFOXO 標的遺伝子 (LymG6Pase、LymPEPCK、LymCatalase)、およびインスリンシグナル伝達経路遺伝子 (LymPI3K、LymAKT、LymTOR) の mRNA 発現量を調べた (n=5 each) (図 4-12)。一般的に、G6Pase と PEPCK は糖新生に、Catalase は酸化ストレスに関与することが知られている。

結果、G6Pase 以外の遺伝子の mRNA 発現量は、摂食させた個体群と比較して 1 日絶食させた個体群で有意に増加していた。G6Pase も有意差はないものの、1 日絶食によって mRNA の上昇傾向が見られた。このことから、絶食状態が LymFOXO の mRNA をアップレギュレートすることで、転写因子として標的遺伝子の mRNA 発現を促進すると共にインスリンシグナル伝達経路遺伝子の mRNA もアップレギュレートすることが示唆された。

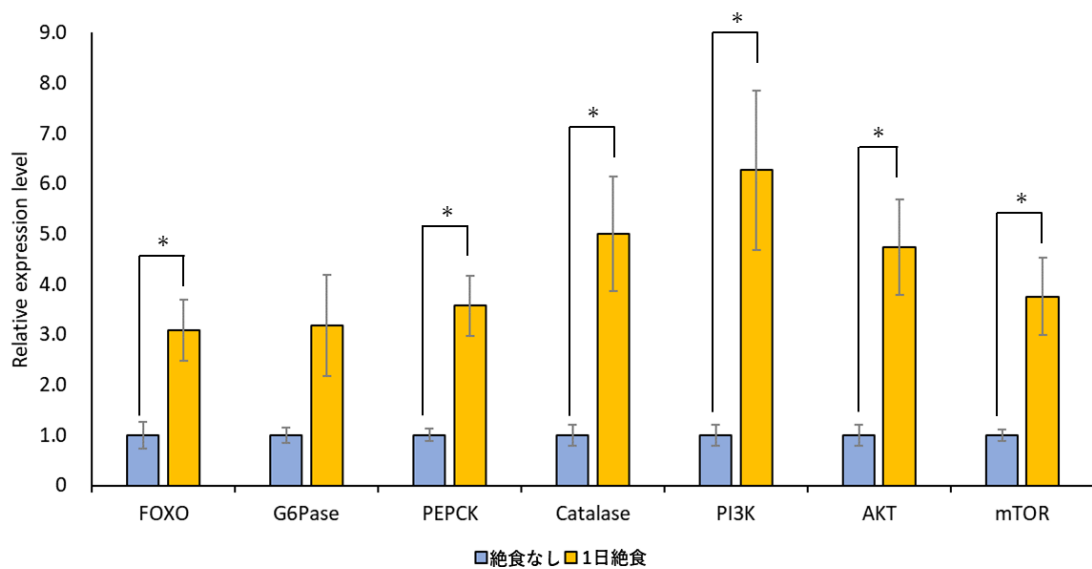


図 4-12. 絶食条件下での mRNA 発現量の変化

mRNA 発現量は β -actin および β -tubulin に対して正規化した後に求め、絶食なし群での発現量を 1 とした相対値で表した。* : $p < 0.05$ 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき一部改変)

次に、学習による LymFOXO の活性化を調べるため、摂食させた個体群に CTA トレーニングを施した後に、各トレーニング群の LymFOXO、LymFOXO 標的遺伝子 (LymG6Pase、LymPEPCK、LymCatalase)、およびインスリンシグナル伝達経路遺伝子 (LymPI3K、LymAKT、LymmTOR) の mRNA 発現量を測定した (control 群、backward 群、naive 群 : $n=5$ 、forward 群 : $n=4$) (図 4-13)。

結果、PEPCK 以外の遺伝子の mRNA 発現量は、学習実験を行っていない control 群と比較して forward 群で有意に増加していた。しかし、LymCatalase、LymPI3K、LymAKT、LymmTOR については、学習の種類に関わらず mRNA 発現量の増加傾向が見られた。

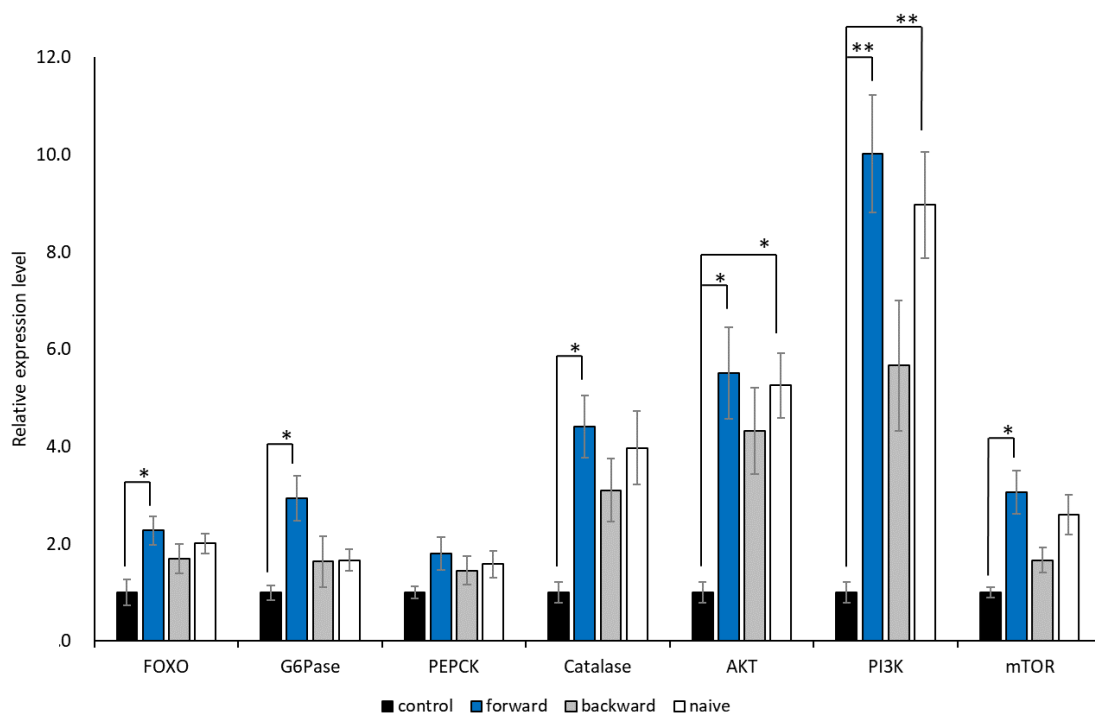


図 4-13. 摂食させたモノアラガイへの学習による mRNA 発現量の変化
 mRNA 発現量は β -actin および β -tubulin に対して正規化した後に求め、control 群での発現量を 1 とした相対値で表した。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。

1 日絶食させた個体群についても、CTA トレーニングを施した後に、各トレーニング群の LymFOXO、LymFOXO 標的遺伝子 (LymG6Pase、LymPEPCK、LymCatalase)、およびインスリンシグナル伝達経路遺伝子 (LymPI3K、LymAKT、LymmTOR) の mRNA 発現量を測定した (control 群、forward 群 : $n=5$ 、backward 群、naive 群 : $n=3$) (図 4-14)。

結果、LymFOXO 以外の遺伝子の mRNA 発現量に有意な差は見られなかった。LymFOXO については、学習の種類に関わらず mRNA 発現量の増加傾向が見られた。

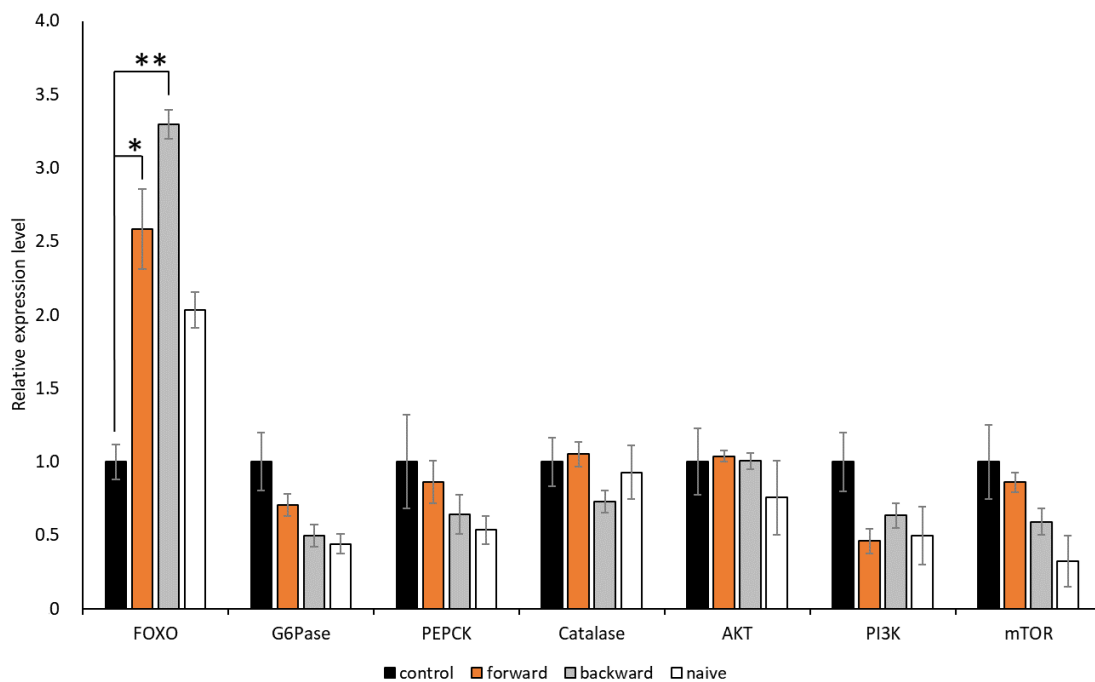


図 4-14. 1 日絶食させたモノアラガイへの学習による mRNA 発現量の変化
 mRNA 発現量は β -actin および β -tubulin に対して正規化した後に求め、
 control 群での発現量を 1 とした相対値で表した。* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 。

インスリン投与群とコントロールである HCl 投与群について、LymFOXO と LymFOXO 標的遺伝子 (LymG6Pase、LymPEPCK、LymCatalase) の mRNA 発現量を調べた (n=4 each) (図 4-15)。結果、LymFOXO 以外の遺伝子については発現量に有意な差は見られなかった。

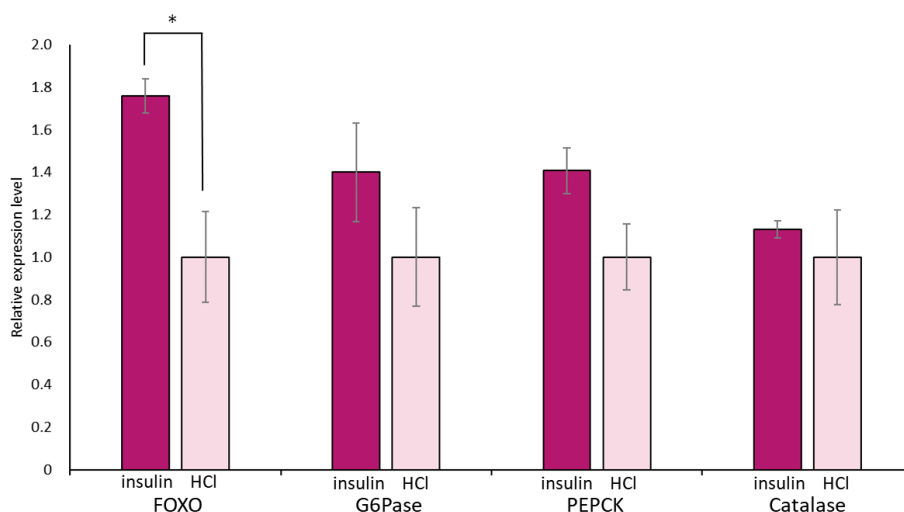


図 4-15. インスリン投与条件下での mRNA 発現量の変化

mRNA 発現量は β -actin および β -tubulin に対して正規化した後に求め、HCl 投与群での発現量を 1 とした相対値で表した。* $p < 0.05$ 。

(Nakai et al. FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*. 2023 より CC-BY 4.0 に基づき引用)

4-4. 考察

本研究により、モノアラガイにも FOXO が存在することが証明された。LymFOXO の推定アミノ酸配列をヒトの FOXO3 アミノ酸配列と比較したところ、AKT によるリン酸化部位が保存されていることが示された。このことから、LymFOXO は他生物種の FOXO と類似する役割をもつと考えられる。つまり、FOXO の主な役割として知られる細胞分裂や代謝、アポトーシスの制御に LymFOXO が関与していることが示唆される。例として、FOXO は神経可塑性やオートファジーにも関与しているが (McLaughlin et al., 2018)、モノアラガイにおいても重度絶食時に CNS 内のタンパク質が分解されることで 5-HT の前駆体であるトリプトファンの量が増加することがわかっている (Totani et al., 2023)。ここから、絶食時には LymFOXO の活性化によりモノアラガイのオートファジーが促進されている可能性が示唆される。

絶食条件下での FOXO の核への移行は他の生物種でも報告されている (Klotz et al., 2015)。また CTA 条件づけ後に LymFOXO が核内に局在してい

たことから、LymFOXO がモノアラガイの学習・記憶機構に関与している可能性が考えられる。LymFOXO タンパク質の局在が学習・記憶能力に重要なニューロンである CGC で確認できたこともこれを裏付ける。一方、FOXO 制御の上流にはインスリンシグナル伝達経路が存在するが、摂食させた個体群の CNS へのインスリン投与は LymFOXO の核への移動をもたらさなかった。これらの結果をまとめると、モノアラガイにおいて絶食状態とインスリンという 2 つの要因が学習能力の向上に関与しているが、FOXO は絶食状態における学習能力向上に関わっており、インスリンシグナル伝達経路の活性化による学習能力向上とは無関係であるという示唆を得た。この発見は、線虫においてインスリン/IGF-1 シグナル伝達とは独立した DAF-16 (FOXO ホモログ) が学習に関与しているという報告と一致する (Vellai et al., 2006; Nagashima et al., 2019)。

FOXO と CREB の関係についても考察する。CREB は学習・記憶能力に関連する転写因子である。線虫の神経系では CREB が DAF-16 (線虫の FOXO ホモログ) の標的遺伝子としてアップレギュレートされることが報告されている (Kaletsky et al., 2016)。FOXO は CREB の共活性化因子である CBP によってアセチル化されることで転写が抑制されるのに対し (Daitoku et al., 2004)、絶食時には CREB の共活性化因子である p300 が FOXO の遺伝子発現を誘導することがわかっている (Wondisford et al., 2014)。モノアラガイにおいては転写活性化因子である LymCREB1 と転写 LymCREB2、LymCBP の cDNA 配列が同定されている (Sadamoto et al., 2004; Hatakeyama et al., 2022)。LymCREB1 と LymCBP は特定のニューロンでのみ発現していたが、LymCREB2 はユビキタスに発現している。このことから、FOXO シグナル伝達は CNS 全体で機能しているが、CREB シグナル伝達は CNS の特定のニューロンで重要な役割を果たしていることが示唆される。

摂食させた個体群では CTA 条件づけ時にいくつかの遺伝子で発現量の増加が起こっており、FOXO が核内に移行することで転写因子として活性化していることが確認できた。しかし、LymCatalase やインスリンシグナル関連遺伝子である LymPI3K、LymAKT、LymmTOR は学習の種類によらず発現が上昇する傾向が見られた。これについては、Catalase はストレス応答にも関与してい

るため、CTA トレーニングそのものがモノアラガイにとってストレスであるためではないかと考えられる。またインスリンシグナル関連遺伝子については、FOXO とは別の経路で活性化している可能性がある。mRNA 発現量の変化とタンパク質発現量の変化、タンパク質の活性化の 3 者は直接結びつくものではないが、インスリンおよびインスリンシグナル関連タンパク質は CTA 条件づけ時に mRNA 発現量が上昇すると同時にタンパク質の活性化も起こっている、という可能性は十分に考えられる。

1 日絶食させた個体群では学習の種類に関わらず FOXO 標的遺伝子およびインスリンシグナル関連遺伝子の発現量に変化は見られなかった。これは、学習の前に軽度絶食による FOXO の核内移行が起こっており、学習の種類による違いが見られなかったと考えられる。しかし、1 日絶食させた個体群では学習能力が向上することを踏まえると、本研究では測定していない特定の遺伝子で CTA 条件づけの種類特異的に mRNA 発現上昇が見られる可能性、もしくは FOXO の活性化が CTA-LTM 形成に最適な内部環境をもたらしている可能性が推測される。

本研究では FOXO が軽度飢餓時の学習能力向上に関与する可能性が示唆されたが、栄養状態と学習能力の間には複雑な関係がある。モノアラガイを用いた先行研究では、軽度絶食時の学習能力と重度絶食時の学習能力の違いについて、オートファジーによる CNS 内 5-HT 含量の調節による影響を受けることが示唆されている (Totani et al., 2023)。また、栄養状態の変化はシグナル伝達経路の変化のみならず、エピジェネティックな変化ももたらす。哺乳類では、親が飢餓を経験すると母胎内にいた子供が代謝関連疾患になる可能性が有意に上昇する (Roseboom et al., 2001)。線虫では、親 (P0) 動物に匂いを用いた嫌悪的連合学習をさせるとその記憶が F1 と F2 の子孫に遺伝すること、匂いをトリガーとする FOXO の核への転座すなわち細胞ストレス応答もまた遺伝することが示されている (Deshe et al., 2023)。モノアラガイにおいて記憶が遺伝する例はまだ知られていないが、飢餓状態などのストレスが子孫に何らかの影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。このように、栄養状態が学習能力に与える影響については、FOXO 以外にも多くの制御があると推測される。

本研究では、インスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO と絶食状態、インスリン、学習との関係を明らかにすることができた。インスリンは FOXO をリン酸化することで核外への移行とユビキチン化による分解 (Matsuzaki et al., 2003) を引き起こすことが知られているが、モノアラガイにおいても同様の働きが見られるかはわかっていない。今後、インスリンが FOXO の活性化を抑制すること、またそれによる学習能力の変化を示すことができれば、インスリンによる学習能力向上と絶食による学習能力向上との関係をより明らかにすることができるだろう。また、FOXO が学習能力に与える影響をより詳細に調べるために、遺伝子組み換え技術を用いた FOXO ノックアウト個体の作製による FOXO ノックアウトが学習能力に及ぼす影響についても調べる必要がある。

第 5 章

総括

本研究では、インスリンが学習能力の向上に関与するという行動学的知見を基に、学習・記憶能力に関連する CNS 内インスリンシグナル伝達経路の解明を目的とした研究を行なった。

第 1 章では、インスリンと学習能力との関係についての背景を整理することで、インスリンの作用が学習能力向上につながることを示すと共にその分子メカニズムの解明を目的とすることを述べた。

第 2 章では、哺乳類の味覚嫌悪学習の特徴である学習時の新規タンパク質合成、記憶の頑強さ、遅延学習が可能という点に着目し、モノアラガイの味覚嫌悪学習においても同様の特徴が見られるのかについて調べた。結果、味覚嫌悪学習中の新規タンパク質合成が記憶形成に重要であること、一度形成された記憶は CS の繰り返し提示による消去ができず頑強であること、US 提示が CS 提示より最大 3 分遅れても学習の習得が可能であることを明らかにした。これらの結果より、味覚嫌悪学習の特徴は種を越えて保存されていることが示唆された。

第 3 章では、学習・記憶能力に関連する CNS 内インスリンシグナル伝達経路を調べるために、二次元電気泳動法およびリン酸化プロテオーム解析による網羅的な解析を実施した。結果、CNS へインスリンを投与することで、AKT/mTOR 経路に含まれるタンパク質のリン酸化または脱リン酸化が起こることや、その下流にある遺伝子発現を制御するタンパク質および細胞骨格関連タンパク質のリン酸化または脱リン酸化が起こることを明らかにした。このことから、インスリン投与により引き起こされる AKT/mTOR 経路の活性化による下流遺伝子の新規遺伝子発現・新規タンパク質合成や細胞骨格の不安定化が学習と結びつくことで、学習・記憶能力の向上がもたらされることが示唆された。

第 4 章では、モノアラガイの味覚嫌悪学習に新規タンパク質合成が必要であることを踏まえて、インスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO に着目した。さらに FOXO がインスリンのみならず絶食状態とも関連していることから、FOXO と絶食状態、インスリン、学習・記憶能力との関係につい

て研究した。FOXO は絶食時に発現が核内に移行して活性化する一方、インスリン投与時には細胞質に留まったままで活性化していなかった。また学習時には発現が核内に移行しており、かつ標的遺伝子の発現を促進させていたことから、絶食状態での学習能力向上に FOXO が関与している一方で、インスリン投与時の学習能力向上には FOXO は関与していない可能性が示唆された。すなわち、FOXO の活性化によって学習能力が向上するが、これはインスリン投与による学習能力向上とは独立していると考えられる。

本研究によって得られた成果をまとめると、モノアラガイの学習・記憶能力には複数のシグナル伝達経路が関わっており、最適な体内環境になったときに学習能力の向上が起こることが示された。具体的には、インスリンと絶食状態、学習能力との間を結ぶ分子メカニズムについて以下のようなことが明らかになった (図 5-1)。

1. インスリン投与時の学習能力向上は、血リンパ中インスリン濃度の上昇による CNS 内での AKT/mTOR 経路の活性化によるものである。
AKT/mTOR 経路下流の転写因子の活性化による新規タンパク質合成や、細胞骨格のリン酸化または脱リン酸化により引き起こされるシナプス可塑性により、長期記憶の形成が促進される。ただし、摂食後に血リンパ中インスリン濃度の上昇が起こる可能性や摂食群では学習能力がそれほど高くないことを考慮すると、恒常性の範囲での血リンパ中インスリン濃度の上昇ではなく、血リンパ中インスリン濃度の急激な変化すなわちインスリンスパイクが重要であると考えられる。
2. 軽度絶食時の学習能力向上は、CNS 内での転写因子 FOXO の活性化によるものである。FOXO が標的遺伝子の新規タンパク質合成を促進することで、長期記憶の形成が促進される。一方でインスリンについては、軽度絶食時に血リンパ中インスリン濃度がどのように変化するのか不明である。しかし、重度絶食時との学習能力の違いや学習時に MIP II の mRNA 発現量が増加していること (Azami et al., 2006) を考慮すると、血リンパ中にある程度は存在しており、学習時に発現が増加することで 1.と同様に長期記憶の形成促進に関与するものであると考えられる。つまり、軽度絶食時には FOXO とインスリンシグナル伝達の両方が記憶の形成に関与しているこ

とが示唆される。

3. 重度絶食時には長期記憶そのものは形成されるが、表現型としては表出しない (Ito et al. 2015)。この時、FOXO は活性化していることから、FOXO は記憶形成プロセスの記録および保持には関与しているが想起には関与していない、もしくは FOXO による学習能力向上よりも重度絶食による想起の阻害が強く引き起こされているということが考えられる。また、絶食により血リンパ中インスリン濃度は低下していると推測されるため、下流のインスリンシグナル伝達は抑制されていると予想される。このとき、重度絶食条件下で CTA 条件づけを行なった後にインスリンを投与すると記憶の表出が起こること (Totani et al. 2020b) から、インスリンは記憶の形成のみならず想起にも重要な役割を持つ可能性がある。

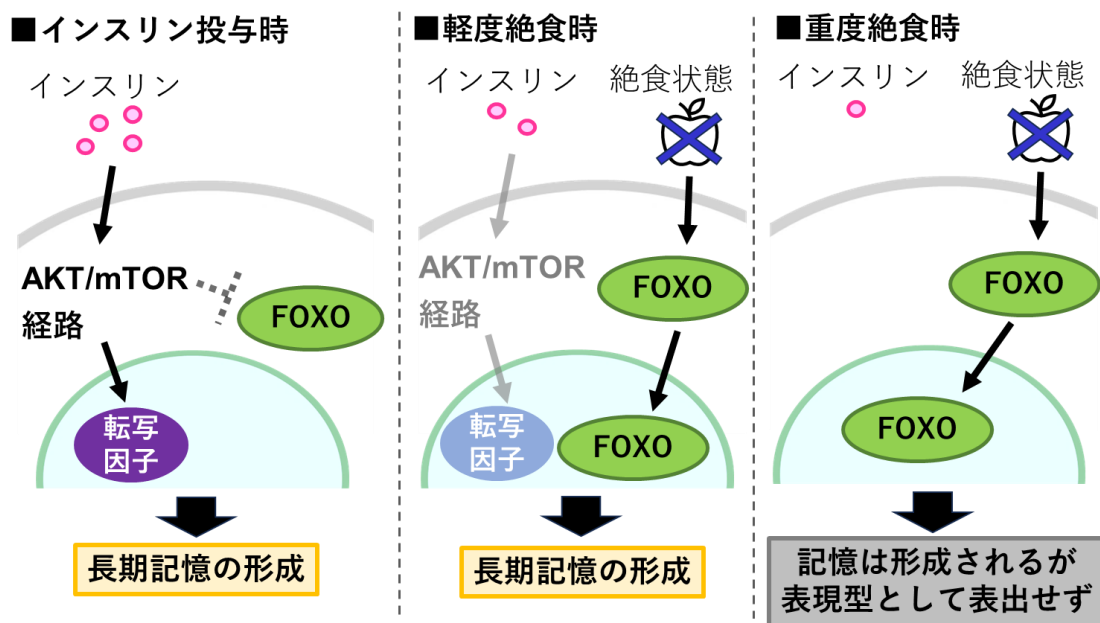


図 5-1. インスリンと絶食状態が学習能力に与える影響

インスリンが学習能力向上をもたらす生物学的意義については、これまでにモノアラガイで体内 MIP 濃度を測定することができていないため詳細は不明である。しかし、インスリンが栄養状態の変化に応じて恒常性を維持する役割を持つことから、栄養状態によるインスリン放出量に応じて採餌などの行動を変化させるためではないかと考えられる。また、絶食の程度による学習能力の

変化について、先行研究において軽度の絶食状態では新しい食べ物を探すために学習能力が向上し、重度の絶食状態ではエネルギー消費を抑えるために学習能力が低下するという最適な生存戦略の選択の結果であると説明されている (Totani et al., 2023)。本研究の結果は上記の説に加えて、味覚嫌悪学習は害のある食物を回避するために飢餓状態でも習得する必要のある、動物の生存にとって重要な機構であることを強く示すものである。

このように、本研究によって、学習能力向上をもたらすインスリンシグナル伝達経路に AKT/mTOR 経路とその下流の遺伝子発現および細胞骨格の不安定化が関わることが明らかとなった。また、インスリンシグナル伝達経路の下流にある転写因子 FOXO はインスリンシグナル伝達経路とは独立して絶食時の学習能力向上に関与することが示された。本研究の成果により、学習能力の向上に関連する分子機構の一端を明らかにした。

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究室に配属されてから現在に至るまで多大なご指導とご教示を賜りました指導教員の早稲田大学 教育・総合科学学術院 伊藤悦朗教授に深く感謝の意を表するとともに心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたっては、多くの先生方よりご助言をいただきました。二次元電気泳動法の実施に際して多くの助言を賜りました北海道医療大学 薬学部 青木隆教授ならびに吉村昭毅教授に深謝いたします。また、免疫染色を始めとした実験手法からデータ解析まで幅広くご相談に乗ってくださった徳島文理大学 薬学部 畠山大准教授に心より感謝いたします。

伊藤研究室のメンバーからは研究生活を共にする中で日々多くの示唆を得ることができました。本当にありがとうございました。

最後に、本研究を行うにあたって支えてくださった多くの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., & Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 88(5), 615–626.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edn. Garland Publishing, Inc, New York.
- Azami, S., Wagatsuma, A., Sadamoto, H., Hatakeyama, D., Usami, T., Fujie, M., Koyanagi, R., Azumi, K., Fujito, Y., Lukowiak, K., & Ito, E. (2006). Altered gene activity correlated with long-term memory formation of conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *Journal of neuroscience research*, 84(7), 1610–1620.
- Baskin, D. G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D., Jr, & Schwartz, M. W. (1999). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain research*, 848(1-2), 114–123.
- Benjamin P. R. (2012). Distributed network organization underlying feeding behavior in the mollusk *Lymnaea*. *Neural systems & circuits*, 2, 4.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 5(4-5), 365–374.
- Castellucci, V. F., Blumenfeld, H., Goelet, P., & Kandel, E. R. (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *Journal of neurobiology*, 20(1), 1–9.
- Chambers, D. B., Androschuk, A., Rosenfelt, C., Langer, S., Harding, M., & Bolduc, F. V. (2015). Insulin signaling is acutely required for long-term memory in *Drosophila*. *Frontiers in neural circuits*, 9, 8.
- Chen, W. Y., Lin, C. L., Chuang, J. H., Chiu, F. Y., Sun, Y. Y., Liang, M. C., & Lin, Y. (2017). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M associates with mTORC2 and regulates muscle differentiation. *Scientific reports*, 7, 41159.
- Christie, J. M., Wenthold, R. J., & Monaghan, D. T. (1999). Insulin causes a transient tyrosine phosphorylation of NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 72(4), 1523–1528.
- Chiu, S. L., Chen, C. M., & Cline, H. T. (2008). Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. *Neuron*, 58(5), 708–719.

- Clark, G. A., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. (1994). Activity-dependent enhancement of presynaptic facilitation provides a cellular mechanism for the temporal specificity of classical conditioning in *Aplysia*. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *1*(4), 243–257.
- Daitoku, H., Hatta, M., Matsuzaki, H., Aratani, S., Ohshima, T., Miyagishi, M., Nakajima, T., & Fukamizu, A. (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(27), 10042–10047.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin*, *96*(3), 518.
- Deshe, N., Eliezer, Y., Hoch, L., Itskovits, E., Bokman, E., Ben-Ezra, S., & Zaslaver, A. (2023). Inheritance of associative memories and acquired cellular changes in *C. elegans*. *Nature communications*, *14*(1), 4232.
- Epstein, H. T., Child, F. M., Kuzirian, A. M., & Alkon, D. L. (2003). Time windows for effects of protein synthesis inhibitors on Pavlovian conditioning in *Hermisenda*: behavioral aspects. *Neurobiology of learning and memory*, *79*(2), 127–131.
- Etscorn, F., & Stephens, R. (1973). Establishment of conditioned taste aversions with a 24-hour CS-US interval. *Physiological Psychology*, *1*(3), 251–253.
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiology of learning and memory*, *63*(3), 291–295.
- Fulton, D., Kemenes, I., Andrew, R. J., & Benjamin, P. R. (2005). A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *The European journal of neuroscience*, *21*(5), 1347–1358.
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, *4*(3), 123–124.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Lawrence, R. C., Wrighten, S. A., Green, A. J., Wilson, S. P., Sakai, R. R., Kelly, S. J., Wilson, M. A., Mott, D. D., & Reagan, L. P. (2015). Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes*, *64*(11), 3927–3936.
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *19*(1), 31–44.

- Hatakeyama, D., Sunada, H., Totani, Y., Watanabe, T., Felletár, I., Fitchett, A., Eravci, M., Anagnostopoulou, A., Miki, R., Okada, A., Abe, N., Kuzuhara, T., Kemenes, I., Ito, E., & Kemenes, G. (2022). Molecular and functional characterization of an evolutionarily conserved CREB-binding protein in the *Lymnaea* CNS. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(11), e22593.
- Heidenreich K. A. (1993). Insulin and IGF-I receptor signaling in cultured neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 692, 72–88.
- Hirano, Y., Masuda, T., Naganos, S., Matsuno, M., Ueno, K., Miyashita, T., Horiuchi, J., & Saitoe, M. (2013). Fasting launches CRTC to facilitate long-term memory formation in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6118), 443–446.
- Huang, W., Zhu, P. J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., Krnjević, K., Roman, G., & Costa-Mattioli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature neuroscience*, 16(4), 441–448.
- Hwangbo, D. S., Gershman, B., Tu, M. P., Palmer, M., & Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature*, 429(6991), 562–566.
- Ito, E., Yamagishi, M., Hatakeyama, D., Watanabe, T., Fujito, Y., Dyakonova, V., & Lukowiak, K. (2015). Memory block: a consequence of conflict resolution. *The Journal of experimental biology*, 218(Pt 11), 1699–1704.
- Jacklet J. W. (1980). Protein synthesis requirement of the *Aplysia* circadian clock. Tested by active and inactive derivatives of the inhibitor anisomycin. *The Journal of experimental biology*, 85, 33–42.
- Jedlicka, P., & Deller, T. (2017). Understanding the role of synaptopodin and the spine apparatus in Hebbian synaptic plasticity - New perspectives and the need for computational modeling. *Neurobiology of learning and memory*, 138, 21–30.
- Jonas, E. A., Knox, R. J., Kaczmarek, L. K., Schwartz, J. H., & Solomon, D. H. (1996). Insulin receptor in *Aplysia* neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ion currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(5), 1645–1658.
- Jonas, E. A., Knox, R. J., Smith, T. C., Wayne, N. L., Connor, J. A., & Kaczmarek, L. K. (1997). Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature*, 385(6614), 343–346.
- Kaletsky, R., Lakhina, V., Arey, R., Williams, A., Landis, J., Ashraf, J., & Murphy, C. T. (2016). The *C. elegans* adult neuronal IIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators. *Nature*, 529(7584), 92–96.

- Katagiri, H., Asano, T., Ishihara, H., Inukai, K., Shibasaki, Y., Kikuchi, M., Yazaki, Y., & Oka, Y. (1996). Overexpression of catalytic subunit p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 271(29), 16987–16990.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461–464.
- Kenyon C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504–512.
- Kim, Y., & Kim, S. H. (2020). WD40-Repeat Proteins in Ciliopathies and Congenital Disorders of Endocrine System. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 35(3), 494–506.
- King, M. R., Anderson, N. J., Liu, C., Law, E., Cundiff, M., Mixcoatl-Zecuatl, T. M., & Jolival, C. G. (2015). Activation of the insulin-signaling pathway in sciatic nerve and hippocampus of type 1 diabetic rats. *Neuroscience*, 303, 220–228.
- Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63(7), 2232–2243.
- Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., & Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox biology*, 6, 51–72.
- Kojima, S., Yamanaka, M., Fujito, Y., & Ito, E. (1996). Differential neuroethological effects of aversive and appetitive reinforcing stimuli on associative learning in *Lymnaea stagnalis*. *Zoological Science*, 13(6), 803-812.
- Kojima, S., Nanakamura, H., Nagayama, S., Fujito, Y., & Ito, E. (1997). Enhancement of an inhibitory input to the feeding central pattern generator in *Lymnaea stagnalis* during conditioned taste-aversion learning. *Neuroscience letters*, 230(3), 179–182.
- Laplanche, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science*, 122(Pt 20), 3589–3594.
- Lee, J. L., & Hynds, R. E. (2013). Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*, 23(3), 233–244.
- Link, W., & Fernandez-Marcos, P. J. (2017). FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. *International journal of cancer*, 141(12), 2379–2391.

- Liu, L., Brown, J. C., 3rd, Webster, W. W., Morrisett, R. A., & Monaghan, D. T. (1995). Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neuroscience letters*, *192*(1), 5–8.
- Lukowiak, K., Adata, N., Krygier, D., & Syed, N. (2000). Operant conditioning in *Lymnaea*: evidence for intermediate- and long-term memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *7*(3), 140–150.
- Lyons, L. C., Gardner, J. S., Gandour, C. E., & Krishnan, H. C. (2016). Role of proteasome-dependent protein degradation in long-term operant memory in *Aplysia*. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *24*(1), 59–64.
- Ma, Y., Gao, J., Yin, J., Gu, L., Liu, X., Chen, S., Huang, Q., Lu, H., Yang, Y., Zhou, H., Wang, Y., & Peng, Y. (2016). Identification of a Novel Function of Adipocyte Plasma Membrane-Associated Protein (APMAP) in Gestational Diabetes Mellitus by Proteomic Analysis of Omental Adipose Tissue. *Journal of proteome research*, *15*(2), 628–637.
- Matsuo, R., Hitomi, T., Watanabe, S., & Kirino, Y. (2002). Delayed-onset amnesia caused by protein synthesis inhibition in odor-taste associative memory of the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Neuroscience letters*, *334*(3), 201–205.
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11285–11290.
- McLaughlin, C. N., & Broihier, H. T. (2018). Keeping Neurons Young and Foxy: FoxOs Promote Neuronal Plasticity. *Trends in genetics : TIG*, *34*(1), 65–78.
- Meester, I., Ramkema, M. D., van Minnen, J., & Boer, H. H. (1992). Differential expression of four genes encoding molluscan insulin-related peptides in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, *269*(1), 183–188.
- Mickley, G. A., Kenmuir, C. L., McMullen, C. A., Yocom, A. M., Valentine, E. L., Dengler-Criss, C. M., Weber, B., Wellman, J. A., & Remmers-Roeber, D. R. (2004). Dynamic processing of taste aversion extinction in the brain. *Brain research*, *1016*(1), 79–89.
- Mickley, G. A., Hoxha, Z., Bacik, S., Kenmuir, C. L., Wellman, J. A., Biada, J. M., & DiSorbo, A. (2007). Spontaneous recovery of a conditioned taste aversion differentially alters extinction-induced changes in c-Fos protein expression in rat amygdala and neocortex. *Brain research*, *1152*, 139–157.

- Mita, K., Okuta, A., Okada, R., Hatakeyama, D., Otsuka, E., Yamagishi, M., Morikawa, M., Naganuma, Y., Fujito, Y., Dyakonova, V., Lukowiak, K., & Ito, E. (2014a). What are the elements of motivation for acquisition of conditioned taste aversion?. *Neurobiology of learning and memory*, *107*, 1–12.
- Mita, K., Yamagishi, M., Fujito, Y., Lukowiak, K., & Ito, E. (2014b). An increase in insulin is important for the acquisition conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *Neurobiology of learning and memory*, *116*, 132–138.
- Murakami, J., Okada, R., Sadamoto, H., Kobayashi, S., Mita, K., Sakamoto, Y., Yamagishi, M., Hatakeyama, D., Otsuka, E., Okuta, A., Sunada, H., Takigami, S., Sakakibara, M., Fujito, Y., Awaji, M., Moriyama, S., Lukowiak, K., & Ito, E. (2013). Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *33*(1), 371–383.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular psychiatry*, *12*(2), 120–150.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*(6797), 722–726.
- Nakai, J., Totani, Y., Kojima, S., Sakakibara, M., & Ito, E. (2020a). Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate neuroscience : IN*, *20*(2), 8.
- Nakai, J., Totani, Y., Hatakeyama, D., Dyakonova, V. E., & Ito, E. (2020b). Another Example of Conditioned Taste Aversion: Case of Snails. *Biology*, *9*(12), 422.
- Nakai, J., Chikamoto, N., Fujimoto, K., Totani, Y., Hatakeyama, D., Dyakonova, V. E., & Ito, E. (2022). Insulin and Memory in Invertebrates. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *16*, 882932.
- Nakai, J., Namiki, K., Fujimoto, K., Hatakeyama, D., & Ito, E. (2023a). FOXO in *Lymnaea*: Its Probable Involvement in Memory Consolidation. *Biology*, *12*(9), 1201.
- Nakai, J., Namiki, K., Totani, Y., Yasumasu, S., Yoshimura, T., Aoki, T., & Ito, E. (2023). Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Biophysics and Physicobiology*, *20*(4), e200038.
- Nagashima, T., Iino, Y., & Tomioka, M. (2019). DAF-16/FOXO promotes taste avoidance learning independently of axonal insulin-like signaling. *PLoS genetics*, *15*(7), e1008297.

- Otsuka, E., Matsunaga, M., Okada, R., Yamagishi, M., Okuta, A., Lukowiak, K., & Ito, E. (2013). Increase in cyclic AMP concentration in a cerebral giant interneuron mimics part of a memory trace for conditioned taste aversion of the pond snail. *Biophysics (Nagoya-shi, Japan)*, *9*, 161–166.
- Ribeiro, M. J., Serfozo, Z., Papp, A., Kemenes, I., O'Shea, M., Yin, J. C., Benjamin, P. R., & Kemenes, G. (2003). Cyclic AMP response element-binding (CREB)-like proteins in a molluscan brain: cellular localization and learning-induced phosphorylation. *The European journal of neuroscience*, *18*(5), 1223–1234.
- Robinson, L. J., Leitner, W., Draznin, B., & Heidenreich, K. A. (1994). Evidence that p21ras mediates the neurotrophic effects of insulin and insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons. *Endocrinology*, *135*(6), 2568–2573.
- Rosas, J. M., & Bouton, M. E. (1996). Spontaneous recovery after extinction of a conditioned taste aversion. *Animal Learning & Behavior*, *24*(3), 341–348.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Ravelli, A. C., Osmond, C., Barker, D. J., & Bleker, O. P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and cellular endocrinology*, *185*(1–2), 93–98.
- Rosenegger, D., Wright, C., & Lukowiak, K. (2010). A quantitative proteomic analysis of long-term memory. *Molecular brain*, *3*, 9.
- Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Colombo, P. J., Lee, D. W., & Serrano, P. A. (1993). Short-term, intermediate-term, and long-term memories. *Behavioural brain research*, *57*(2), 193–198.
- Sadamoto, H., Sato, H., Kobayashi, S., Murakami, J., Aonuma, H., Ando, H., Fujito, Y., Hamano, K., Awaji, M., Lukowiak, K., Urano, A., & Ito, E. (2004). CREB in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: cloning, gene expression, and function in identifiable neurons of the central nervous system. *Journal of neurobiology*, *58*(4), 455–466.
- Sadamoto, H., Takahashi, H., Okada, T., Kenmoku, H., Toyota, M., & Asakawa, Y. (2012). De novo sequencing and transcriptome analysis of the central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* by deep RNA sequencing. *PloS one*, *7*(8), e42546.
- Sakakibara, M., Kawai, R., Kobayashi, S., & Horikoshi, T. (1998). Associative learning of visual and vestibular stimuli in *Lymnaea*. *Neurobiology of learning and memory*, *69*(1), 1–12.
- Saltiel A. R. (2021). Insulin signaling in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, *131*(1), e142241.

- Sangha, S., Scheibenstock, A., McComb, C., & Lukowiak, K. (2003a). Intermediate and long-term memories of associative learning are differentially affected by transcription versus translation blockers in *Lymnaea*. *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 10), 1605–1613.
- Sangha, S., Scheibenstock, A., Morrow, R., & Lukowiak, K. (2003b). Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(30), 9842–9851.
- Sattelle, D. B., & Lane, N. J. (1972). Architecture of gastropod central nervous tissues in relation to ionic movements. *Tissue & cell*, 4(2), 253–270.
- Semaniuk, U., Piskovatska, V., Strilbytska, O., Strutynska, T., Burdyliuk, N., Vaiserman, A., Bubalo, V., Storey, K B., & Lushchak, O. (2021). *Drosophila* insulin-like peptides: from expression to functions—a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(2), 195-208.
- Schwartz, M. W., Sipols, A. J., Marks, J. L., Sanacora, G., White, J. D., Scheurink, A., Kahn, S. E., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Figlewicz, D. P. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, 130(6), 3608–3616.
- Siddle K. (1992). The insulin receptor and type I IGF receptor: comparison of structure and function. *Progress in growth factor research*, 4(4), 301–320.
- Silverman-Gavrila, L. B., Senzel, A. G., Charlton, M. P., & Feng, Z. P. (2011). Expression, phosphorylation, and glycosylation of CNS proteins in aversive operant conditioning associated memory in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, 186, 94–109.
- Smit, A. B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R. H., Geraerts, W. P., Klootwijk, J., & Joosse, J. (1988). Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, 331(6156), 535–538.
- Smit, A. B., Geraerts, P. M., Meester, I., van Heerikhuizen, H., & Joosse, J. (1991). Characterization of a cDNA clone encoding molluscan insulin-related peptide II of *Lymnaea stagnalis*. *European journal of biochemistry*, 199(3), 699–703.
- Smith, M. C., Coleman, S. R., & Gormezano, I. (1969). Classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response at backward, simultaneous, and forward CS-US intervals. *Journal of comparative and physiological psychology*, 69(2), 226–231.

- Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., & Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(9), 3791–3796.
- Sugai, R., Azami, S., Shiga, H., Watanabe, T., Sadamoto, H., Kobayashi, S., Hatakeyama, D., Fujito, Y., Lukowiak, K., & Ito, E. (2007). One-trial conditioned taste aversion in *Lymnaea*: good and poor performers in long-term memory acquisition. *The Journal of experimental biology*, *210*(Pt 7), 1225–1237.
- Sutton, M. A., Masters, S. E., Bagnall, M. W., & Carew, T. J. (2001). Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in aplysia. *Neuron*, *31*(1), 143–154.
- Tcherkezian, J., & Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell*, *99*(2), 67–86.
- Tomioka, M., Adachi, T., Suzuki, H., Kunitomo, H., Schafer, W. R., & Iino, Y. (2006). The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, *51*(5), 613–625.
- Totani, Y., Nakai, J., Hatakeyama, D., & Ito, E. (2020a). Memory-enhancing effects of short-term fasting. *The European Zoological Journal*, *87*(1), 597–602.
- Totani, Y., Nakai, J., Dyakonova, V. E., Lukowiak, K., Sakakibara, M., & Ito, E. (2020b). Induction of LTM following an Insulin Injection. *eNeuro*, *7*(2), ENEURO.0088-20.2020.
- Totani, Y., Nakai, J., Hatakeyama, D., Dyakonova, V. E., Lukowiak, K., & Ito, E. (2023). CNS serotonin content mediating food deprivation-enhanced learning is regulated by hemolymph tryptophan concentration and autophagic flux in the pond snail. *Nutritional neuroscience*, *26*(3), 217–227.
- Vellai, T., McCulloch, D., Gems, D., & Kovács, A. L. (2006). Effects of sex and insulin/insulin-like growth factor-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *174*(1), 309–316.
- Wagatsuma, A., Sugai, R., Chono, K., Azami, S., Hatakeyama, D., Sadamoto, H., & Itoi, E. (2004). The early snail acquires the learning. Comparison of scores for conditioned taste aversion between morning and afternoon. *Acta biologica Hungarica*, *55*(1-4), 149–155.

- Walia, V., Cuenca, A., Vetter, M., Insinna, C., Perera, S., Lu, Q., Ritt, D. A., Semler, E., Specht, S., Stauffer, J., Morrison, D. K., Lorentzen, E., & Westlake, C. J. (2019). Akt Regulates a Rab11-Effector Switch Required for Ciliogenesis. *Developmental cell*, *50*(2), 229–246.e7.
- Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*, *388*(6643), 686–690.
- Wilcoxon, H. C., Dragoin, W. B., & Kral, P. A. (1971). Illness-induced aversions in rat and quail: Relative salience of visual and gustatory cues. *Science*, *171*(3973), 826–828.
- Wondisford, A. R., Xiong, L., Chang, E., Meng, S., Meyers, D. J., Li, M., Cole, P. A., & He, L. (2014). Control of Foxo1 gene expression by co-activator P300. *The Journal of biological chemistry*, *289*(7), 4326–4333.
- Wu, S., Stogios, N., Hahn, M., Navagnanavel, J., Emami, Z., Chintoh, A., Gerretsen, P., Graff-Guerrero, A., Rajji, T. K., Remington, G., & Agarwal, S. M. (2023). Outcomes and clinical implications of intranasal insulin on cognition in humans: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, *18*(6), e0286887.

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：中居 詢子 印

(2024 年 2 月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
原著論文	
○	[1] Nakai J , Namiki K, Totani Y, Yasumasu S, Yoshimura T, Aoki T, Ito E. Changes in protein phosphorylation by insulin administration in the central nervous system of the gastropod mollusk <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Biophys Physicobiol</i> . 2023 Oct 12;20(4).
	[2] Chikamoto N, Fujimoto K, Nakai J , Namiki K, Hatakeyama D, Ito E. Genes Upregulated by Operant Conditioning of Escape Behavior in the Pond Snail <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Zoolog Sci</i> . 2023 Oct;40(5):375-381.
	[3] Chikamoto N, Fujimoto K, Nakai J , Totani Y, Hatakeyama D, Ito E. Expression Level Changes in Serotonin Transporter are Associated with Food Deprivation in the Pond Snail <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Zoolog Sci</i> . 2023 Oct;40(5):382-389.
○	[4] Nakai J , Namiki K, Fujimoto K, Hatakeyama D, Ito E. FOXO in <i>Lymnaea</i> : Its Probable Involvement in Memory Consolidation. <i>Biology (Basel)</i> . 2023 Sep 1;12(9):1201.
	[5] Totani Y, Nakai J , Hatakeyama D, Dyakonova VE, Lukowiak K, Ito E. CNS serotonin content mediating food deprivation-enhanced learning is regulated by hemolymph tryptophan concentration and autophagic flux in the pond snail. <i>Nutr Neurosci</i> . 2023 Mar;26(3):217-227.
	[6] Fujimoto K, Totani Y, Nakai J , Chikamoto N, Namiki K, Hatakeyama D, Ito E. Identification of Putative Molecules for Adiponectin and Adiponectin Receptor and Their Roles in Learning and Memory in <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Biology (Basel)</i> . 2023 Feb 27;12(3):375.
	[7] Nakai J , Totani Y, Kojima S, Sakakibara M, Ito E. Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i> . <i>Invert Neurosci</i> . 2020 May 8;20(2):8.
○	[8] Totani Y, Nakai J , Dyakonova VE, Lukowiak K, Sakakibara M, Ito E. Induction of LTM following an Insulin Injection. <i>eNeuro</i> . 2020 Apr 27;7(2):ENEURO.0088-20.2020.

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：中居 詢子

印

(2024 年 2 月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
総説論文	<p>[1] Nakai J., Chikamoto N, Fujimoto K, Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Ito E. Insulin and Memory in Invertebrates. <i>Front Behav Neurosci.</i> 2022 Apr 26;16:882932.</p> <p>[2] Nakai J., Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Ito E. Another Example of Conditioned Taste Aversion: Case of Snails. <i>Biology (Basel).</i> 2020 Nov 26;9(12):422.</p> <p>[3] Totani Y, Nakai J., Hatakeyama D, Ito E. Memory-enhancing effects of short-term fasting. <i>Eur. Zool. J.</i> 2020 Oct 8;87(1):597-602</p> <p>[4] Totani Y, Nakai J., Ito E. Impact of Insulin on Memory Recall. <i>J Data Mining Genomics Proteomics.</i> 2020 Jul 6;11:225.</p>
学会発表	<p>[1] 中居詢子, 並木健悟, 伊藤悦朗. The effect of the transcription factor FOXO on learning and memory ability in the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i>. 日本比較生理生化学会第 45 回大会, 大阪府豊中市. (2023 年 12 月 2 日~3 日)</p> <p>[2] Junko Nakai, Kengo Namiki, Etsuro Ito. The function of the transcription factor FOXO in the central nervous system of the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i>. 11th World Congress of Neuroscience (IBRO 2023), Granada Spain. (2023 年 9 月 9 日~13 日)</p> <p>[3] 中居詢子, 並木健悟, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝の中樞神経系における転写因子 FOXO の役割. 日本動物学会第 94 回大会, 山形県山形市. (2023 年 9 月 7 日~9 日)</p> <p>[4] 中居詢子, 伊藤悦朗. Localization and changes of the transcription factor FOXO in the central nervous system of the pond snail <i>Lymnaea stagnalis</i>. 日本比較生理生化学会第 44 回大会, 高知県高知市. (2022 年 11 月 26 日~27 日)</p> <p>[5] 中居詢子, 伊藤悦朗. インスリン刺激時のモノアラガイ単離脳に対するリン酸化プロテオミクス解析. 日本生物物理学会第 60 回大会, 北海道函館市. (2022 年 9 月 28 日~30 日)</p> <p>[6] 中居詢子, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝の中樞神経系内における転写因子 FOXO の局在. 日本動物学会第 93 回大会, 東京都新宿区. (2022 年 9 月 8 日~10 日)</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名：中居 詢子

印

(2024 年 2 月 現在)

種別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>[7] 中居詢子, 伊藤悦朗. インスリンを作用させた淡水産巻貝中枢神経系のリン酸化プロテオーム解析. 日本動物学会関東支部第 74 回大会, オンライン. (2022 年 3 月 5 日)</p> <p>[8] 中居詢子, 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. Proteome analysis of insulin signalling associated with learning and memory in the CNS of pond snail. 日本比較生理生化学会第 43 回大会, オンライン. (2021 年 12 月 4 日～5 日)</p> <p>[9] 中居詢子, 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝中枢神経系内のインスリンシグナル伝達経路の解析. 日本動物学会第 92 回大会, オンライン. (2021 年 9 月 2 日～4 日)</p> <p>[10] 中居詢子, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝の中枢神経系におけるインスリンシグナル伝達経路関連遺伝子の探索. 日本動物学会関東支部第 73 回大会, オンライン. (2021 年 3 月 20 日)</p> <p>[11] 中居詢子, 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. Protein changes induced by insulin application in the isolated CNS of <i>Lymnaea stagnalis</i>. 日本比較生理生化学会第 42 回大会, 山形県山形市. (2020 年 11 月 22 日～23 日)</p> <p>[12] 中居詢子, 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. 淡水産巻貝中枢神経系内のインスリン作用機序の解析 — 蛍光標識二次元電気泳動法によるアプローチ. 日本動物学会第 91 回大会, オンライン. (2020 年 9 月 4 日～5 日)</p> <p>[13] 中居詢子, 戸谷勇輝, 伊藤悦朗. 二次元電気泳動法による淡水産巻貝中枢神経系タンパク質の分離・分析. 日本動物学会関東支部第 72 回大会, オンライン. (2020 年 3 月 14 日)</p>
獲得研究費	<p>[1] 早稲田オープン・イノベーション・エコシステム挑戦的研究プログラム(W-SPRING) 2021 年度 - 2023 年度</p> <p>[2] 早稲田大学 若手研究者育成・支援事業「アーリーバードプログラム」 2022 年度, 2023 年度</p>